

Lymphatische Mikrogefäßdichte in benignen und malignen Läsionen der Mamma

*Quantitative immunhistochemische Analyse der
Antikörper D2-40 und LYVE-1 mit einer Untersuchung
der Korrelation zur synchronen nodalen Metastasierung*

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Klaus Apel
geboren am 26.11.1967 in Bad Langensalza**

Gutachter

- 1. PD Dr. rer. nat. A. Berndt,
Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena**
- 2. Univ.-Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl,
Institut für Pathologie am Helios-Klinikum Erfurt**
- 3. PD Dr. med. habil. H. Wunderlich,
Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.09.2008

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Das Mammakarzinom- eine medizinische Herausforderung	3
2.2	Prognostische Faktoren für das Mammakarzinom	4
2.2.1	Patientenalter und ethnische Herkunft	4
2.2.2	Axillärer Lymphknotenstatus	5
2.2.3	Tumorgröße	6
2.2.4	Pathohistologischer Tumortyp und Grading	6
2.2.5	Lymphgefäß- und Gefäßinvasion	7
2.3	Faktoren mit prognostischer und prediktiver Aussagekraft beim Mammakarzinom	8
2.3.1	Prognostischer und prediktiver Wert des Hormonrezeptorstatus	8
2.3.2	Prognostischer und prediktiver Wert des Her2/neu- Status und sich heute daraus ergebende therapeutische Konsequenzen	9
2.3.3	Prognostische und prediktive Aussagekraft der invasionsassoziierten Proteine	10
2.3.4	Prognostische und prediktive Aussagekraft von Proliferationsmarkern und weitere molekularbiologische Faktoren	10
2.3.5	Prognostischer und prediktiver Wert des Genetic Profiling	12
2.4	Prognostische Bedeutung der Angiogenese	13
2.5	Prognostische Relevanz der Lymphangiogenese	14
3.	Aufgabenstellung	16
4.	Material und Methoden	18
4.1	Gewebsmaterial	18
4.2	Konventionelle Histologie	19
4.2.1	Paraffineinbettung/ HE- Färbung	19
4.3	Diagnosestellung	20
4.4	Immunhistochemie	23
4.4.1	Immunhistochemische Technik- (LSAB-Methode)	23
4.4.2	Primäre Antikörper und histologische Beurteilung der untersuchten Gewebeproben	24
4.5	Quantitative Bewertung der lymphatischen Mikrogefäßdichte	25

4.6	Statistische Auswertung	26
4.7	Verzeichnis der Puffer-und Farblösungen	27
4.7.1	Hämalaun nach Meyer	27
4.7.2	PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	27
5.	Ergebnisse	28
5.1	Eignung der Antikörper zur Erfassung von Lymphgefäßen in der Mamma	28
5.2	Kreuzreaktionen der Antikörper	30
5.2.1	Kreuzreaktionen des Antikörpers D2-40 mit nichtlymphoendothelialen Strukturen des Mammaparenchyms und der anhaftenden Dermis	30
5.2.2	Kreuzreaktionen des Antikörpers LYVE-1	33
5.3	Analyse der Lymphgefäßdichte	33
5.3.1	Lymphgefäßdichte in mastopathischen Brustdrüsengewebe	33
5.3.2	Lymphgefäßdichte in Fibroadenomen und Phylloides Tumoren	34
5.3.3	Lymphgefäßverteilung in Assoziation zu intraduktalen Neoplasien	39
5.3.4	Lymphgefäßdichte im invasiv-duktalem Mammakarzinom	41
5.3.5	Lymphgefäßdichte im invasiv-lobulären Karzinom der Mamma	43
5.3.6	Lymphgefäßdichte in Mammakarzinomtypen, nicht als duktales oder lobulär klassifiziert	44
5.4	Lokalisation der Lymphgefäße in malignen Läsionen der Mamma	45
5.5	Ergebnisse der quantitativen Bewertung der lymphatischen Mikrogefäßdichte in Relation zur pT/pN-Kategorie in Läsionen der Mamma	46
5.6	Ergebnisse der statistischen Bewertung	50
5.6.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus DCIS und Milchgangspapillom als intraduktale Proliferationen	50
5.6.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung pT1c pN0 versus pT1c pN1	51
5.6.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung pT2 pN0 versus pT2 pN1	52
5.6.4	Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus pT1-4 pN0/1	53
5.6.5	Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus pT1 pN0/1	54

6.	Diskussion	55
6.1	Angiogenese - ein prognoserelevanter Parameter und ein neues Target für die onkologische Therapie	55
6.2	D2-40 - Der geeignete Antikörper zur immunhistochemischen Markierung von Lymphgefäßen im Mammaparenchym	56
6.2.1	Einschränkungen der Lymphgefäßdichtebestimmung und Immunmarkierung der Lymphendothelzellen bei Applikation der Antikörper D2-40 und Antikörper LYVE-1	57
6.3	Der Vergleich der Antikörper D2-40 und LYVE-1 zur Lymphgefäßdichtebestimmung	57
6.4	Invasive Karzinome der Mamma sind durch eine hohe Lymphgefäßdichte gekennzeichnet	59
6.5	Unterschiede zwischen Hämangiogenese und Lymphangiogenese im invasiven Mammakarzinom	61
6.6	Die lymphatische Mikrogefäßdichte - ein Indikator für die nodale Metastasierung	62
6.7	Die lymphatische Mikrogefäßdichte in Fibroadenomen	62
6.8	Die Bedeutung von fehlenden Lymphgefäßen für Karzinome in Fibroadenomen der Mamma	63
6.9	Die Erhöhung der lymphatischen Mikrogefäßdichte - ein potentieller Indikator der nodalen Metastasierung	65
6.10	Anti-Lymphangiogenese- eine mögliche Option der Therapie Solider Tumore	67
7.	Schlussfolgerungen	69
8.	Literaturverzeichnis	70

1. Zusammenfassung

In den westlichen Industriestaaten ist das Mammakarzinom das häufigste Karzinom der weiblichen Bevölkerung. Verschiedene prognostische und prediktive Faktoren haben einen Einfluss auf den Verlauf und letztendlich auf das Überleben bei dieser Erkrankung. Eine besondere Bedeutung kommt der Angioneogenese zu. Mit dem Modell zur Angioneogenese hat die Arbeitsgruppe um Folkman bereits frühzeitig einen wichtigen Beitrag zum Verständnis um diese Vorgänge geleistet (Folkman et al. 1966). Die Signifikanz der Angioneogenese für die Tumorprogression und Prognose der Patienten insgesamt ist gut dokumentiert und allgemein anerkannt. In der vorliegenden Arbeit soll unter Adaptation des von Weidner angewendeten Verfahrens zur Messung der Gefäßdichte in Tumoren die Lymphgefäßdichte in benignen und malignen Läsionen der Mamma bestimmt werden. Die Frage, ob eine Erhöhung der Lymphgefäßzahl bei Mammakarzinomen eine signifikant erhöhte Rate an axillären Lymphknotenmetastasen nach sich zieht, ist zu klären. Essentiell ist die Möglichkeit der isolierten Darstellung von lymphoendothelialen Strukturen. Zwei immunhistochemische Marker sind hierfür verfügbar. Der polyklonale Antikörper LYVE-1 und der monoklonale Antikörper D2-40 sind in der vorliegenden Arbeit vergleichend auf ihre Eignung zur Darstellung der lymphatischen Strukturen im Brustgewebe zum Einsatz gekommen. Gewebsmaterial von 102 Patienten mit benignen und malignen Läsionen im Bereich der Mamma wurden in die Untersuchung einbezogen. Die Gewebeproben wurden in Adaptation des von Weidner beschriebenen Verfahrens der mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigten sich, wie in der vorliegenden Literatur beschrieben, auch Kreuzreaktionen der Antikörper gegen nicht lymphatische Strukturen. Im Falle des Antikörpers D2-40 sind diese im Vergleich zum Antikörper LYVE-1 deutlich mehr ausgeprägt. Der Antikörper LYVE-1 markierte im Brustgewebe nicht sicher alle lymphoendothelialen Strukturen. Nach der eigenen vergleichenden Analyse erscheint der Antikörper D2-40 für Mammagewebe besser geeignet zu sein als der Antikörper LYVE-1. Die Verteilung der Lymphgefäße, insbesondere in Mammakarzinomen, ist nicht homogen. Nicht in allen Fällen von Neoplasien der Mamma waren lymphgefäßdichte Bezirke nachzuweisen. Die statistische Testung auf eine Signifikanz der erhobenen Messwerte erfolgte nach einer Gruppenbildung analog der Eingruppierung der histologischen Diagnose. Die zur statistischen

Vergleichsprüfung gebildeten Gruppen bestanden aus: Mastopathie versus DCIS; pT1c pN0 versus pT1c pN1; pT2 pN0 versus pT2 pN1; Mastopathie versus pT1-4 pN0/1; Mastopathie versus pT1a-c pN0/1.

In der statistischen Auswertung konnte der Nachweis erbracht werden, dass im Falle von axillären Lymphknotenmetastasen eine Erhöhung der Lymphgefäßzahl im Tumor besteht. Dies war insbesondere mit Hilfe des Antikörpers D2-40 beweisbar. Die Erhöhung der lymphatischen Gefäßdichte ist also nachweislich ein Indikator für die nodale Metastasierung beim Mammakarzinom. Die lymphatische Mikrogefäßdichte ist als unabhängig von anderen etablierten Prognosefaktoren wie etwa Tumorgroße und Grading anzusehen, hier bestehen keine nachweisbaren Korrelationen. In die Untersuchung ist ein Fall eines auf ein Fibroadenom beschränkten Mammakarzinoms mit einbezogen worden. Wie auch bei den anderen untersuchten Fibroadenomen konnten in diesem Fall keine Lymphgefäße im eigentlichen Tumor gefunden werden. Daraus ergibt sich der Ansatz, dass auf Grund der zumindest deutlich eingeschränkten Kompetenz dieser Tumorentität zur lymphatischen Metastasierung, eine Klärung des axillären Lymphknotenstatus nicht erforderlich ist. Hingegen konnte in der eigenen Untersuchung der Nachweis erbracht werden, dass bei Mammatumoren der Kategorie pT1 mit nodaler Metastasierung eine signifikante Erhöhung der Lymphgefäßzahl vorliegt. Die eigene Untersuchung bestätigt damit den direkten Zusammenhang zwischen der erhöhten Lymphgefäßdichte und einer nodalen Metastasierung. Damit steht sie im Einklang mit der Mehrzahl von publizierten Untersuchungen. Somit sind prinzipiell Rückschlüsse auf die Prognose der Erkrankung denkbar. Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes an diesem Punkt der Kaskade der Tumorprogression. Andererseits ist eine Deeskalierung der Therapie bei günstiger Prognose denkbar. Offensichtlich bestehen jedoch konzeptionelle Unterschiede zwischen der Hämangio- und der Lymphangiogenese. Eine Fortsetzung der Untersuchungen zur Lymphangiogenese erscheint nützlich und sinnvoll. Untersuchungen zur Korrelation von lymphatischer Mikrogefäßdichte und dem Gesamtüberleben sind dafür notwendig. Damit wird die Möglichkeit gegeben darzustellen, welchen Teil der Stromainduktion und Tumorprogression die lymphatische Mikrogefäßdichte beschreibt.

2. Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom- eine medizinische Herausforderung

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industriestaaten das häufigste Karzinom der weiblichen Bevölkerung mit über einer Million Neuerkrankungen jährlich weltweit. Die Inzidenz des Mammakarzinoms wird für Mitteleuropa mit 78,22 und für Nordamerika mit 90,41 pro 100.000 Einwohner angegeben (Ferlay et al. 2001). In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich etwa 47500 Patientinnen und Patienten an Brustkrebs. Der Anteil der tumorbedingten Mortalität für Deutschland beträgt 17,1 % (AG Bevölkerungsbez. Krebsregister in D. 2002). Die Erkrankung am Mammakarzinom ist immer ein entscheidender und schwerwiegender Prozess im Leben der Betroffenen und ihrer Umgebung. Daher ergibt sich eine Bedeutung auf psychischer, physischer, sozialer und auch ökonomischer Ebene.

Die Anstrengungen richten sich weltweit neben einer breiten Grundlagenforschung auch auf eine Optimierung der therapeutischen Strategien auf Basis der Evidenz basierten Medizin, um letztendlich eine Ergebnisverbesserung für die Patienten zu erreichen. In der Bundesrepublik Deutschland wurde zur Optimierung und Standardisierung bei trotzdem individuell gestalteter Therapie für die betroffenen Patienten die S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms inauguriert (Kreienberg et al. 2008). Eine Aktualisierung der Leitlinie an die weitere Entwicklung bei der Therapie des Mammakarzinoms ist in diesem Jahr erfolgt. Ziel der S3-Leitlinie ist es, die Diagnostik und Therapie bei Mammakarzinompatienten zu optimieren. Um für Patienten die Effektivität dieses Prozesses voll nutzen zu können bedarf es aber der korrekten Einschätzung des Krankheitsverlaufes. Dazu ist es erforderlich, Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen, frühzeitig zu detektieren und in die Planung des Therapieschemas mit einzubeziehen.

Ein großer Teil der Faktoren, die für die frühzeitige individuelle Einschätzung des Verlaufs der Erkrankung und auch für das Rezidivrisiko der Patienten von Bedeutung sind, sind tumorbiologischer Natur.

Wenn durch das Zusammentreffen von mehreren günstigen prognostisch relevanten Faktoren im individuellen Fall auf therapeutische Maßnahmen verzichtet werden

kann, ohne das für den Patienten ein nachgewiesen erhöhtes Risiko für ein Karzinomrezidiv zu erwarten ist, kann damit dem Patienten eine belastende Therapie erspart werden. So ist es möglich, dass auch mit den für die Gesamtheit zur Verfügung stehenden finanziellen Ressourcen ohne Qualitätsverlust im Einzelfall adäquat umgegangen werden kann. Im Umkehrschluss kann bei erkannter ungünstiger Prognose für die Patienten frühzeitig mit einer aggressiven Therapie mit entsprechendem Benefit begonnen werden.

2.2 Prognostische Faktoren für das Mammakarzinom

2.2.1 Patientenalter und ethnische Herkunft

Über den Einfluss des Alters der Patienten bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms auf die Prognose gibt es einige Untersuchungen. Die meisten Studien schließen jedoch relativ geringe Patientenzahlen ein und haben widersprüchliche Ergebnisse, sodass hier eine eindeutige Grundaussage nicht möglich ist (Cianfrocca und Goldstein 2004). Zwei relativ große Studientrials weisen eine deutlich schlechtere Prognose für Patienten die jünger als 35 Jahre sind aus (Nixon et al. 1994, Albain et al. 1994).

Ein Einfluss der Zugehörigkeit zu verschiedenen Rassen scheint vorhanden zu sein. So haben Frauen schwarzer Hautfarbe oder lateinamerikanischer Herkunft eine deutlich geringere Überlebensrate im Vergleich zu Frauen weißer Hautfarbe (Elledge et al. 1994). Die Ursache liegt hierbei sicher in einem multifaktoriellen Geschehen. So wird das Mammakarzinom bei afroamerikanischen Frauen durchschnittlich erst in einem späteren Stadium diagnostiziert als bei einer vergleichbaren Population weißer Patientinnen (Pierce et al. 1992).

Alter und ethnische Herkunft der Patienten haben eine Bedeutung, müssen aber, wenn möglich, zur Einschätzung mit den Aussagen anderer prognostischer Faktoren kombiniert werden.

2.2.2 Axillärer Lymphknotenstatus

Ein signifikanter prognostischer Indikator für Patienten mit Mammakarzinom ist das Vorhandensein oder Fehlen von axillären Lymphknotenmetastasen (Gonzales-Vela et al. 1999, Lin et al. 1993). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl von befallenen Lymphknoten und dem Risiko, ein Rezidiv des Karzinoms zu erleiden (Saez et al. 1989, Shin et al. 2000, Megale-Costa et al. 2004). In Studien wird zur Überprüfung des Einflusses des Lymphknotenstatus auf den Patientenoutcome oft eine Einteilung in Anlehnung an das National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) vorgenommen. Die Einteilung hinsichtlich des Lymphknotenstatus erfolgt in 4 Gruppen: nodal negativ, 1-3 positive Lymphknoten, 4-9 positive Lymphknoten, 10 und mehr positive Lymphknoten (Cianfrocca und Goldstein 2004). Die 5-Jahres Überlebensraten liegen bei nodal-negativen Patienten bei 82,8 %, in der Gruppe 1-3 positive Lymphknoten bei 73 %, in der Gruppe 4-12 befallene Lymphknoten bei 45,7 % und bei 13 und mehr befallenen Lymphknoten nur bei 28,4 % (Fisher et al. 1983). An diesen Daten kann man die prognostische Bedeutung des Lymphknotenstatus bei fehlenden adjuvanten therapeutischen Maßnahmen erkennen, welche das Rezidivrisiko um etwa 20 % reduzieren (Lagares-Garcis et al. 2000). Für Patienten mit einem niedrigen Risiko, speziell für nodal negative Patienten, sind zusätzliche prognostische Faktoren erforderlich (Arnaud et al. 2004, Brenin et al. 1999, Colleoni et al. 2004). Üblicherweise wird der axilläre Lymphknotenstatus durch die axilläre Lymphknotendissektion, welche die Level I und II beinhaltet, erhoben (Keshtgar und Baum 2004, Bembenek und Schlag 2000). In den letzten Jahren wurde die Sentinel-Lymphknotenbiopsie auch beim Mammakarzinom eingeführt und validiert (Kelley et al. 2004). Dieses Verfahren wurde zuerst beim Staging des malignen Melanoms angewandt (Morton et al. 1992). Die Erstbeschreibung für das Mammakarzinom erfolgte durch Giuliano (Giuliano et al. 1994).

Aufgrund des Einflusses des axillären Lymphknotenstatus auf die Prognose der Patienten ist dieser als einer der Hauptfaktoren zur Entscheidungsfindung für die Durchführung einer adjuvanten Therapie anzusehen.

2.2.3 Tumorgröße

Die Tumorgröße korreliert mit dem Vorhandensein und der Anzahl von axillären Lymphknotenmetastasen. Ebenso besteht zwischen der Tumorgröße und dem Auftreten von Fernmetastasen und Tumorrezidiven ein direkter Zusammenhang. Deshalb wird von einigen Autoren die Primärtumorgröße bei Diagnose in ihrer Bedeutung für das Patientenschicksal vor den Lymphknotenstatus gerückt (Hölzel et al. 2001, Bourez et al. 2002).

Betrachtet man Patienten welche nodal negativ sind, so lässt sich bei einer Tumorgröße kleiner als 1 cm eine 5-Jahres Überlebensrate von 99 Prozent, bei einer Tumorgröße von 1-3 cm von 89 Prozent und bei Tumoren zwischen 3 und 5 cm von 86 Prozent erheben (Carter et al. 1989).

Der Überlebensvorteil für kleine Tumoren bleibt auch bei einem *follow-up* über 20 Jahre bestehen (Rosen et al. 1993). Bei nodal negativen Patienten ist die Tumorgröße einer der wichtigsten prognostischen Faktoren (Ahlgren et al. 2004).

2.2.4 Pathohistologischer Tumortyp und Grading

Die pathologischen Charakteristika der Tumoren haben prognostische Signifikanz (Korkolis et al. 2004). Nachweislich haben histologisch-morphologische Subtypen wie das tubuläre, das cribriforme, das muzinöse und das medulläre Karzinom eine deutlich bessere Prognose als das nicht-spezifizierte invasive Mammakarzinom (Kreienberg et al. 2004). Diesem wird durch die Aufnahme in die aktuelle WHO-Klassifikation der Mammatumoren Rechnung getragen (Wittekind et al. 2002).

Das Tumorgrading kann mittels verschiedener Systeme durchgeführt werden. Die historisch am weitesten verbreitete Klassifikation ist die Scarff-Bloom-Richardson-Klassifikation (Bloom und Richardson 1957). Der mitotische Index, die Differenzierung und der Kernpleomorphismus erhalten jeweils einen Punktwert von 1 bis 3. Die sich ergebenden Bewertungen der drei Kategorien werden abschließend summiert. Tumoren mit einem Score von 3 –5 werden als gut differenziert (Grad 1), mit einem Score von 6 – 7 werden als mäßig differenziert (Grad 2), mit einem Score

von 8 – 9 werden als schlecht differenziert (Grad 3) bezeichnet. Die Korrelation zwischen dem histologischen Grading und der 5-Jahres Überlebensrate, und damit die prognostische Bedeutung des Gratings, wurde durch mehrere Arbeitsgruppen bewiesen (Berg und Robbins 1966, Cianfrocca und Goldstein 2004).

Eine Weiterentwicklung für das Brustgewebe ist das Tumorgading nach Ellston und Ellis, welches in der aktuellen WHO-Klassifikation zur Anwendung kommt (Ellston und Ellis 1991). Die Kriterien für dieses Grading finden sich in der Tabelle 1.

Merkmal	Bewertung
Formation in Gängen und Azini	
Überwiegen des Tumors (>75%)	1
Moderate Abweichung (10-75%)	2
Kleine oder keine Abweichung (<10%)	3
Kernpleomorphismus	
kleine, regulär uniforme Zellen	1
moderates Ansteigen von Größe und Variabilität	2
markante Variationen	3
Mitotische Zahl	
abhängig von der Größe des Mikroskopfeldes	1-3

Tabelle 1. Semi-quantitative Methode des histologischen Gratings für Brustgewebe nach Ellston und Ellis

2.2.5 Lymphgefäß- und Gefäßinvasion

Der Einbruch des Tumors in Lymph- und Blutgefäße ist für das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen von Wichtigkeit (Alitalo und Carmeliet 2002, He et al. 2004). Hierbei zeigt sich die Bedeutung des Tumoreinbruchs für die Prognose der Patienten (Hirakawa et al. 2003). Zum Beispiel bei der Untersuchung von nodal

negativen Patienten mit Lymphgefäß- und Gefäßeinbruch durch die International Breast Cancer Study Group zeigte sich ein Ansteigen des Rezidivrisikos von 15 Prozent. Dieser Fakt bleibt unbeeinflusst davon, ob die Gabe einer perioperativen Chemotherapie erfolgte oder nicht (Neville et al. 1992).

2.3 Faktoren mit prognostischer und prediktiver Aussagekraft beim Mammakarzinom

2.3.1 Prognostischer und prediktiver Wert des Hormonrezeptorstatus

Das Vorhandensein von Estrogen- und Progesteronrezeptoren im invasiven Mammakarzinom hat sowohl eine prognostische als auch eine prediktive Bedeutung für die Patienten (Kute et al. 2004).

Um die prognostische Bedeutung herausarbeiten zu können, muss der Einfluss einer adjuvanten Hormontherapie ausgeschaltet werden. In der NSABP-Studie 06 wurden Patienten ohne adjuvante Therapie mit Mammakarzinom hinsichtlich des weiteren Krankheitsgeschehens nach Hormonrezeptorstatus untersucht (Fisher et al. 1988). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Vorteil sowohl beim krankheitsfreien Überleben als auch beim insgesamten Überleben zugunsten der hormonrezeptorpositiven Patienten. Bei Untersuchungen mit längerem *follow-up* zeigte sich jedoch, dass dieser Vorteil nicht persistiert (Hisenbeck et al. 1998). Vielmehr konnte herausgearbeitet werden, dass die Gabe von Tamoxifen bei positivem Rezeptorstatus bei jeglichem Nodalstatus einen Benefit für die Patienten bringt (Fisher et al. 1998).

Damit ergibt sich der Wert des Hormonrezeptorstatus vor allem als prediktiver Faktor für den Benefit durch den Einsatz von Antiöstrogenen, da die prognostische Bedeutung zwar vorhanden, aber limitiert ist.

2.3.2 Prognostischer und prediktiver Wert des Her2/neu-Status und sich heute daraus ergebende therapeutische Konsequenzen

Eine Reihe von Onkoproteinen und Wachstumsfaktoren wurden beschrieben. Hierzu gehört auch der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR). Von besonderer Bedeutung ist hier das Her2/neu Rezeptorprotein als ein Teil der Wachstumsfaktorrezeptorfamilie. Her2/neu ist in niedriger Konzentration auch im normalen Brustgewebe nachweisbar. Die Überexpression beim invasiven Karzinom geht mit einer erhöhten Tumoraggressivität, einer erhöhten Rate an Rezidiven und einer erhöhten Mortalität bei nodal-positiven Patienten einher (Kronqvist et al. 2004). Retrospektive Analysen untersuchten die prediktive Rolle von Her2/neu im Hinblick auf die Wirksamkeit von Zytostatika und endokriner Therapie. Verschiedene Studien zeigten Resistenz bei einer zytostatischen Therapie mit Alkylantien und Her2/neu-Überexpression, bei einem *follow-up* über 20 Jahre konnte dies aber nicht bestätigt werden (Menard et al. 2001, Cook et. al 2001).

Die therapeutische Bedeutung der Her2/neu-Überexpression besteht in dem heute möglichen Einsatz von Trastuzumab. Trastuzumab ist ein zielgerichteter Antikörper gegen das Her2/neu-Rezeptorprotein. Diese Überexpression liegt in etwa 15 - 20 % aller Mammakarzinome vor und ist durch eine Genamplifikation auf chromosomaler Ebene verursacht (Dietel et al. 2007).

Durch den Einsatz von Trastuzumab ist bei Patienten mit einem metastasiertem Mammakarzinom eine deutliche Verlängerung des Überlebens zu beobachten (Iwata 2007).

Auch die positiven Ergebnisse der multinationalen HERA-Studie haben die Bedeutung des Her2/neu-Status für die Prognose auch bei früher Mammakarzinomerkrankung gezeigt. Die HERA-Studie hat mit dem Nachweis einer Senkung des Rezidivrisikos um 46% bei Einsatz von Trastuzumab nach adjuvanter Chemotherapie hier eindrucksvolle Ergebnisse gehabt (Piccart-Gebhart et al. 2005).

Sowohl die Ergebnisse des Einsatzes des zielgerichteten Antikörpers beim metastasierten Brustkrebs als auch der adjuvante Einsatz zeigen den Stellenwert des Her2/neu-Rezeptorproteins in der aktuellen Therapie des Mammakarzinoms und den sich daraus ergebenden Nutzen für die Patienten.

2.3.3 Prognostische und prediktive Aussagekraft der invasions-assozierten Proteine

Weiterhin besteht die molekularbiologische Möglichkeit zur Bestimmung von invasions-fördernden Proteinen. Dieser Gruppe zugehörig sind die Cathepsine, speziell das Cathepsin B und D. Die Aussagefähigkeit zur prognostischen Bedeutung ist in Studien erwiesen worden. Der routinemäßige Einsatz im klinischen Alltag erfolgt jedoch nicht (Esteva und Hortobagyi 2004).

Zur gleichen Gruppe gehören auch der Urokinase-type Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Inhibitor PAI-I (Manders et al. 2004). Beide spielen ebenfalls bei der Tumorinvasion und Metastasierung eine Schlüsselrolle (Mazar et al. 1999, Durand et al. 2004). Sie wurden in Studien validiert und erreichen den höchsten *level of evidence* (Harbeck et al. 2004). Beide sind sowohl prognostisch als auch prediktiv signifikant. Nodal-negative Patienten mit niedrigem uPA/PAI I haben auch ohne systemische adjuvante Therapie ein krankheitsfreies Überleben nach 5 Jahren von über 90%. Hingegen Patienten mit hohem uPA/PAI I-Spiegel haben ein deutlich höheres Rezidivrisiko (Harbeck et al. 2002).

Den prediktiven Wert der uPA/PAI I-Spiegel zeigte die Analyse von Harbeck (Harbeck et al. 2002). Hier konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit hoher Enzymaktivität einen deutlich größeren Vorteil von einer adjuvanten Chemotherapie hatten als solche mit einem niedrigen Wert. Da ein Untersuchungskit kommerziell verfügbar ist, ist ein Einsatz in der Routine möglich, jedoch momentan auf Ausnahmen beschränkt (Korkolis et al. 2004). Insgesamt muss man feststellen, dass der Nachweis von invasionsassozierten Proteinen eine hohe Aussagekraft besitzt, aber nur einen kleinen Ausschnitt der Metastasierungskaskade darstellt.

2.3.4 Prognostische und prediktive Aussagekraft von Proliferationsmarkern und weitere molekularbiologische Faktoren

Auf Grund der entscheidenden Verbesserungen der molekularbiologischen Techniken gibt es inzwischen eine Reihe von Proliferationsmarkern, bei denen ein Zusammenhang mit der Tumorprognose nachgewiesen werden konnte (Corandini und Daidone 2004, Noguchi et al. 2000).

Zu den modernen Markern gehören Proteine der S-Phase Fraktion (Sutherland und Mushgrove 2004). In letzter Zeit ist hierbei insbesondere das Cyclin E in den Mittelpunkt der Forschung gerückt (Moroy und Geisen 2004). Weitere Marker der Tumorerproliferation, welche heute relativ häufig angewendet werden, sind Antikörper gegen Proliferationsantigene wie zum Beispiel gegen Ki – 67 (Buxant et al. 2002). Durch die intensive Untersuchung dieses Markers liegen ausreichend gesicherte Daten vor, die einen hohen *level of evidence* für den Einsatz generieren (Esteva und Hortobagyi 2004). Die Tumorerproliferation kann durch weitere Marker gemessen werden. Solche sind zum Beispiel der mitotische Index, Thymidin labeling index, Mitosin, Topoisomerase II, weitere Cycline (PNCA, A, D) und DNA-Polymerase (Bilir et al. 2004, Daidone et al. 2004). Durch die intensive Forschung auf dem Gebiet der Molekularbiologie gibt es aktuell eine Vielzahl von Faktoren, die einen Aussagewert zur Prognose auch beim Mammakarzinom haben (Cavallaro und Christofori 2004, Cavallaro et al 2002, Hirvonen et al. 2003). Eine Aufstellung einer Auswahl von weiteren Faktoren findet sich in Tabelle 2.

Proliferationsmarker	Mitotischer Index, Mitosin, Histone(H2,H3),Topoisomerasell, DNA-Polymerase (alpha, delta),
Invasionsassoziierte Proteine	angiogenetische Faktoren und Inhibitoren (TIMP 1-4), Matrix-Metallo-proteinasen (MMP-2,MMP-9 Stomelysin 3)
Wachstumsassoziierte/Onkoproteine	HER-3, HER-4,TGF (beta-1, beta-2), IGF,IGFR,IGFBP, pS2
Tumorsupressor Gene	Drg-1,nm23, BTG
Stress-Proteine	hsp27, hsp70, hsp90

Tab. 2 weitere molekularbiologische Prognosefaktoren

In Studien konnte der Nachweis für die prognostische und prediktive Aussagekraft erbracht werden, jedoch erfolgte die Prüfung an meist relativ kleinen Fallzahlen (Corandini und Daidone 2004, Jaquemier et al. 2000). Ein Einsatz im klinischen Alltag erscheint momentan noch nicht möglich.

Der Wert der einzelnen molekularbiologischen Faktoren ist insgesamt unbestritten. Sie zeigen jedoch jeweils nur einen Aspekt in der komplexen Kaskade der Tumorbologie. Ein leicht zu nutzender Marker, der große Anteile dieser Kaskade repräsentiert, ist derzeit noch nicht validiert.

2.3.5 Prognostischer und prediktiver Wert des Genetic Profiling

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Microarray-Analyse zur Identifizierung von Genexpressionsprofilen prognostischen und prediktiven Aussagewert hat (Hunang et al. 2003). Unter Nutzung der Oligonucleotide - Microarrays gelang Vijver und Mitarbeitern die Klassifikation von insgesamt 295 Patienten mit frühem Mammakarzinom anhand ihrer Genexpressionsstruktur in Gruppen mit guter und schlechter Prognose (van de Vijver et al. 2003). Im 10-Jahres-Follow-up ließ sich die statistische Signifikanz der gewonnenen Daten für das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben nachweisen. Zusätzlich zur erweiterten prognostischen Aussage scheint eine Vorhersage des Therapieerfolges möglich. Anhand von prätherapeutischen Feinnadelaspirationspräparaten wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Es konnte daraus ein genetisches Profil identifiziert werden, durch welches eine komplette pathologische Remission bei neoadjuvanter Chemotherapie vorherzusagen möglich war (Pusztai et al. 2003).

Insgesamt scheint im *genetic profiling* eine Methode zu bestehen, die die prognostische und prediktive Genauigkeit deutlich verbessern kann. Um einen Routineeinsatz zu ermöglichen, ist aber eine Überprüfung in prospektiv-randomisierten Studien mit großen Fallzahlen erforderlich (Brice 2004). Nur hierbei kann der Beweis für die Aussagekraft zweifelsfrei erbracht werden.

Eine weitere Variante mit prognostischer Bedeutung sind die Basalzell-ähnlichen Karzinome. Diese stellen einen Subtyp der invasiven Karzinome dar, welche sich durch spezielle Genexpressionsprofile identifizieren lassen (Sorlie, 2001). Immunophenotypisch sind diese Karzinome durch eine „Triple-Negativität“ gekennzeichnet. Diese „Triple - Negativität“ ist durch eine Negativität der Estrogen-, Progesteron- und Her2/*neu*-Rezeptoren charakterisiert. Zudem ist der Nachweis von basalem Cytokeratin (CK5/6, CK 14, CK 17) positiv (Nielsen 2004, Livasy 2005).

2.4 Prognostische Bedeutung der Angiogenese

Das Wachstum eines Tumors ist von seiner Versorgung abhängig (Leek 2001). Bereits 1966 beschrieb Folkman den im Tiermodell erbrachten Beweis für diese Aussage. Das Tumorstadium ist abhängig von einer Größe von 2 mm wenn das Gewebe nicht perfundiert wird (Folkman et al. 1966). Der Schluss aus dieser Beobachtung war, dass Tumoren darüber hinaus nur weiter an Größe zunehmen können, wenn sie durch Blutgefäße versorgt werden. Auf Grund der Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnte diese Theorie bereits Anfang der 70'er Jahre bestätigt werden (Folkman 2003). Dadurch wurde der Beweis erbracht, dass das Tumorstadium vom Vorhandensein einer Angiogenese abhängig ist. Die Expansion des Tumors über eine Größe von etwa 10^6 Zellen führt zu einer Induktion von neuen kapillaren Blutgefäßen. Diese ermöglichen es den Tumorzellen, Anschluss an den Blutkreislauf zu bekommen. Die Induktion der Angiogenese wird durch spezifische Moleküle (*proangiogenic proteins*) unter Einbeziehung von Makrophagen vermittelt (Folkman 2002). Mit dem Erreichen des Blutgefäßsystems hat der Tumor die Möglichkeit des exzessiven Wachstums und kann potentiell metastasieren (Fox et al. 2001; Rice und Quinn 2002). Es ergibt sich eine Einteilung des Tumorstadiums in eine prävasculäre und vaskuläre Phase (Martin et al. 1997). Untersuchungen bei verschiedenen Tumorentitäten (Cervixkarzinom, Karzinom der Harnblase) zeigten, dass die prävasculäre Phase über Jahre persistieren kann und mit einem limitierten Tumorstadium assoziiert ist, in der eine Metastasierung unwahrscheinlich ist (Weidner et al. 1991). Daher ergibt sich die Bedeutung des Eintretens in die vaskuläre Phase. Dieser Fakt ist für alle Tumortypen essentiell (Bamberger und Peretti 2002; Vermeulen et al. 1995, Jaeger et al. 1995, Liang et al. 2004). Weidner und Mitarbeiter untersuchten die Beziehung zwischen Angiogenese und Metastasierung speziell am Mammakarzinom intensiv. Als Indikator für die Angiogenese wurde die Mikrogefäßdichte (*microvessel density*) eingeführt. Die Mikrogefäßdichte scheint bei allen Tumorentitäten eine hohe prognostische Aussagekraft zu haben (Prall et al. 2003; Alitalo 2002). Auf Grund der engen Korrelation zwischen einer erhöhten Mikrogefäßdichte und vermehrtem Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen konnte ein signifikanter und prognostisch relevanter Indikator für das Mammakarzinom dargestellt werden (Weidner et al.

1991; Weidner et al. 1992). Dieser Marker ist allgemein eingeführt und akzeptiert (Sauer und Deissler 2003). Durch die prognostische Relevanz der Angiogenese ergibt sich die Möglichkeit von therapeutischen Ansätzen (Ellis et al. 2001; Nilson et al. 2001; Borsi et al. 2003). Der Einsatz von antiangiogenen Substanzen erscheint zum jetzigen Zeitpunkt als hoffnungsvolle Option in der zukünftigen Karzinomtherapie (Folkman 2003).

2.5 Prognostische Relevanz der Lymphangiogenese

Intensive Untersuchungen haben den Beweis für die Wichtigkeit der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren-Fraktion (VEGF) bei der Angiogenese erbracht (Risau 1997, Dales et al. 2004). Die Signaltransduktion von VEGF erfolgt über zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren, den VEGFR-1 und den VEGFR-2. Beide sind hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, an Gefäßendothelzellen exprimiert. An lymphatischen Endothelien findet sich ein weiterer VEGF-Rezeptor, der VEGFR-3. Liganden für den VEGFR-3 sind nur VEGF-C und VEGF-D. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der wachstums- und tumorassoziierten Lymphangiogenese und lymphatischen Metastasierung (Plate 2001, Cunnick et al 2002, Ji und Kato 2003, Dales et al 2004). Untersuchungen am Tiermodell bestätigten die These, dass Tumoren in der Lage sind, eine eigene Lymphangiogenese zu aktivieren (Mandriota 2001; Stacker et al. 2002). Da das lymphatische System einer der Hauptwege der Tumordissemination ist, kommt diesem Fakt eine entscheidende Bedeutung zu (Tille et al. 2004, Evoric et al. 2003). Fraglich ist, ob das Tiermodell auch auf den Menschen übertragen werden kann. Jedenfalls besteht eine enge Korrelation zwischen hohen VEGF-Spiegeln in menschlichen Primärtumoren und einer erhöhten Rate an Lymphknotenmetastasen (Nisato et al. 2003, Beasley et al. 2002). Dieses trifft auch für das Mammakarzinom zu (Jaquemier et al. 2000). Auf Grund der Ergebnisse der molekularbiologischen Forschung rückt die Erforschung der Prozesse der Lymphangiogenese in den Mittelpunkt des Interesses (Cunnick et al. 2002, Reis-Filho und Schmitt 2003). Die Signifikanz der Angiogenese für die Tumorprogression und Prognose der Patienten insgesamt ist gut dokumentiert und allgemein

anerkannt. Für die Lymphangiogenese steht die Evaluierung noch aus. Von entscheidendem Nutzen für die weitere Erforschung ist die Möglichkeit der isolierten Darstellung von Lymphgefäßen (Karkkainen und Alitalo 2002, Karkkainen et al. 2002). Grundvoraussetzungen zur weiteren Untersuchung von lymphatischen Endothelien ist die Verfügbarkeit von immunhistochemischen Markern (Kahn et al 2002, Kahn und Marks 2002). Dazu gehört unter anderem Podoplanin (Birner et al. 2000). Kommerziell verfügbar sind der polyklonale Antikörper LYVE-1 und der monoklonale Antikörper D2-40. Das Anfärbungsverhalten beider Antikörper wurde bei verschiedenen Gewebearten geprüft und validiert (Kaiserling 2004, Banerji et al. 1999, Kahn et al. 2002). Für die Darstellung von Lymphgefäßen im Mammakarzinom wurde bisher vor allem der Marker LYVE-1 verwendet (Jackson et al. 2001, Cunnick et al. 2002, Kato et al. 2005). Die Bedeutung der Lymphangiogenese speziell für das Mammakarzinom ist inzwischen ebenfalls untersucht worden (William et al. 2003, Vleugel et al. 2004). Eine Nutzung der neuen Antikörper in Kombination zur Darstellung von Lymphgefäßen erfolgte hierbei nicht, folglich ist für das Mammakarzinom auch eine vergleichende Wertung nicht verfügbar.

3. Aufgabenstellung

Ziel der Dissertation ist die Untersuchung der immunhistochemischen Markierung von Lymphgefäßen im Gewebe der Mamma bei benignen und malignen Veränderungen unter Nutzung von zwei allgemein verfügbaren Antikörpern gegen Lymphendothelzellen. Folgende Fragen bzw. Zusammenhänge sollen analysiert werden:

1. Ist der polyklonale Antikörper LYVE 1 und der monoklonale Antikörper D2-40 zur Darstellung von Lymphgefäßen im Mammakarzinom, bei benignen Läsionen des Brustgewebes und im normalen Mammagewebe geeignet? Werden alle histologisch erkennbaren Lymphgefäße durch die Antikörper markiert? Besteht eine zusätzliche Detektion von nicht-lymphoendothelialen Zellen?
2. Liegt bei Mammakarzinomen mit synchroner Metastasierung in die axillären Lymphknoten und standardisiertem pT-Status eine geänderte Dichte der Lymphgefäße im Vergleich zu nodalnegativen Karzinomen vor? Ist der Nachweis der Lymphangioneogenese unter Adaptation des von der Angioneogenese bekannten Verfahrens (Weidner et al. 1991) mit den Antikörpern LYVE 1 und D2-40 möglich?
3. Ist es in Analogie zur Bestimmung der *microvessel density* möglich, die Lymphgefäßdichte im Mammakarzinom als Prediktor zur Vorhersage des Risikos auf eine nodale Metastasierung im Bereich der Axilla zu nutzen?

4. Besteht bei den Antikörpern LYVE 1 und D2-40 ein Unterschied hinsichtlich des Anfärbungsverhaltens der Lymphgefäße und der Anzahl der angefärbten Lymphgefäße? Ist das Färbungsverhalten von nichtlymphatischen Strukturen vergleichbar?

5. Ist der Nachweis von Lymphgefäßen in Fibroadenomen möglich? Ergeben sich daher bei Karzinomen, die auf das Fibroadenom beschränkt sind, Möglichkeiten einer auf die Tumorbilogie abgestimmten Therapie?

4. Material und Methoden

4.1 Gewebsmaterial

Die untersuchten Präparate entstammen sämtlich aus dem Einsendegut des Institutes für Pathologie des Helios Klinikum Erfurt. Der Einsendezeitraum lag zwischen Juli 2003 und Mai 2004. Das Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme und Eingang in dem Labor für die weitere Bearbeitung aufbereitet.

Untersucht wurden Gewebeproben von 100 Patientinnen und zwei Patienten männlichen Geschlechts. Ausgewertet wurden 22 benigne Läsionen (Mastopathien, Fibroadenome, Phylloides tumor), 3 ductale Carcinoma in situ (DCIS), 1 Milchgangspapillom, 50 invasiv ductale, 18 invasiv lobuläre, 3 tubuläre, 2 papilläre und 2 medulläre Mammakarzinome, sowie ein apokrines Mammakarzinom. Eine grafische Aufbereitung findet sich in Abbildung 1.

Die Klassifikation erfolgte anhand der aktuellen WHO-Klassifikation der Brusttumoren (Tavassoli und Deville 2003).

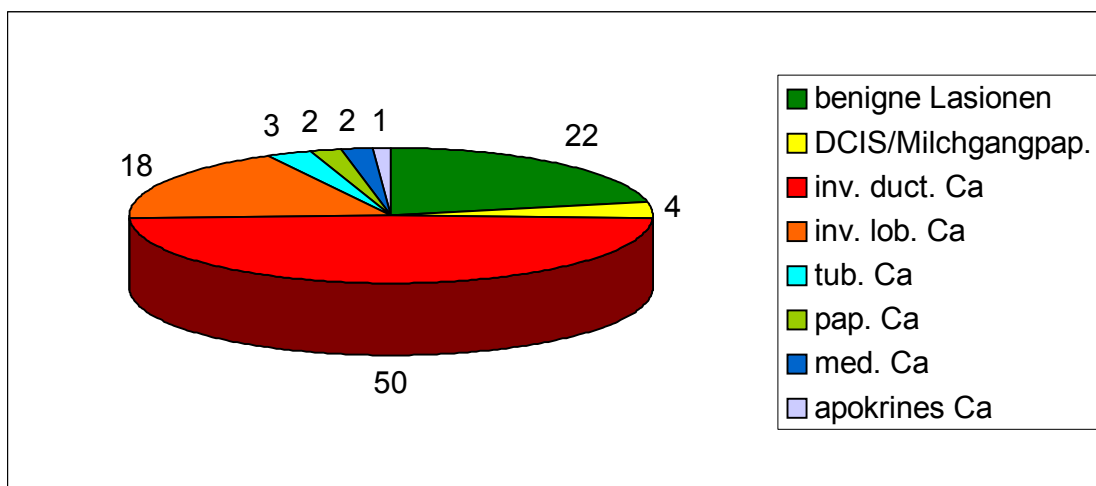


Abb.1 Aufstellung entsprechend Diagnose

Der Einschluss der Proben in die Untersuchung erfolgte konsekutiv anhand des Eingangs in das Labor. Die Spanne der Altersverteilung lag zwischen 16 Jahren (Patientin mit einem Fibroadenom) und 89 Jahren (Patientin mit einem invasiv-ductalen Karzinom) eine genaue Altersverteilung findet sich in Abbildung 2.

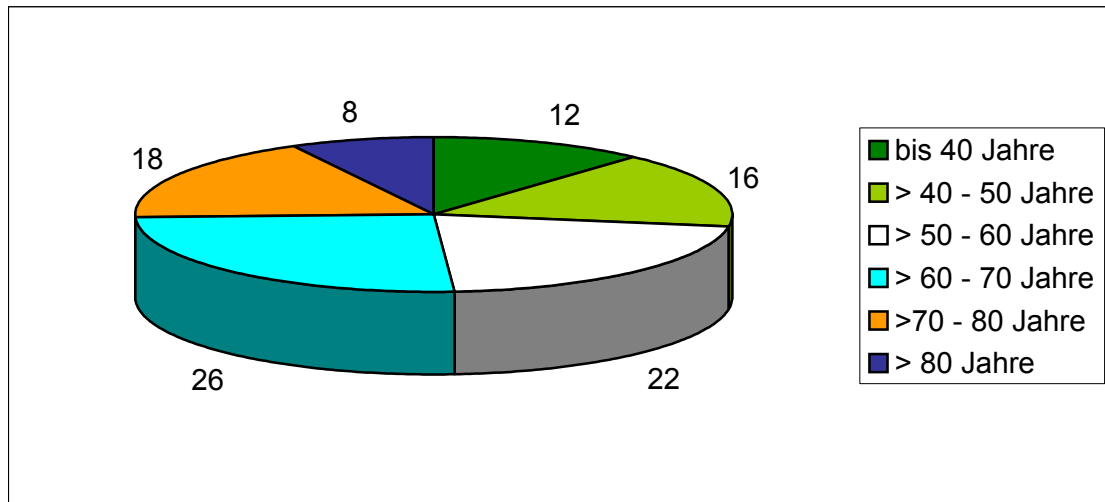


Abb. 2 Darstellung der Altersverteilung

4.2 Konventionelle Histologie

4.2.1 Paraffineinbettung/ HE- Färbung

Das Gewebe wurde am Tag der Entnahme in 4% PBS-gepuffertem Paraformaldehyd für mindestens 4 h fixiert. Die Einbettung erfolgte in Histo-Comp (Vogel) im Einbettautomaten Tissue-Tek der Firma Sakura. Zur histologischen Bewertung der Präparate, insbesondere der Kern/Plasma-Differenzierung, wurde eine Hämalaun-Eosin (H&E)-Färbung durchgeführt. Vom eingebetteten Material wurden 2-3 µm starke Paraffinschnitte angefertigt (Schlittenmikrotom HM 400, Microm), 25 min bei 60° C im Umluftofen getrocknet (TDO 66, medite) und wie nachfolgend beschrieben entparaffiniert:

3x Xylol für je 5 min, 2x Alkohol 100 % für je 5 min, 1x Alkohol 96 % für 5 min, 1x Alkohol 70 % für 5 min, 2x Aqua destillata für je 5 min.. Unmittelbar danach erfolgte die Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer für 20 min, dann Spülen in Aqua dest. und Bläuen unter fließendem Wasser. Anschließend erfolgte die Färbung in Eosin G-

Lösung (Merck) für 3 min. Abschließend wurden die Präparate in 70 % Ethanol gespült, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und in neutralem Kanadabalsam eingedeckt.

4.3 Diagnosestellung

Die Stellung der Diagnose erfolgte am H&E-gefärbten Präparat durch einen Facharzt für Pathologie. Weitergehende immunhistochemische Verfahren wurden bei unklarer Diagnose in diesem Stadium veranlasst. Die Diagnose wurde in jedem Fall durch eine unabhängige zweite Befundung bestätigt. Die Klassifikation der malignen Tumoren erfolgte anhand der aktuell gültigen TNM-Klassifikation für maligne Tumoren (Wittekind et al. 2002). Die Einteilung erfolgte entsprechend. Die Klassifikation wurde in den Tabellen 3 – 5 dargestellt.

Primärtumor (pT)	
pT X	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor ≤ 2 cm (in seiner größten Ausdehnung)
pT1a	Tumor $< 0,5$ cm
pT1b	Tumor $0,5 - 1,0$ cm
pT1c	Tumor $1,0 - 2,0$ cm
pT2	Tumor $2,0 - 5,0$ cm
pT3	Tumor $> 5,0$ cm
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Vorhandensein von Hautödem, Ulzeration der Haut, Satellitenmetastasen der Haut der ipsilateralen Brust
pT4c	Kriterien von T4a und T4b gemeinsam
pT4d	Inflammatorisches Karzinom

Tab.3 pT-Kriterium (nach Wittekind et al..2002)

Regionäre Lymphknoten (pN)	
pNx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden aber klinisch unauffällig waren
pN1a	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten (mind. einer >2mm)
pN1b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. mit mikroskop. Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, jedoch klinisch unauffällig
pN1c	Kriterien wie bei pN1b sowie Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch auffälligen ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. bei Fehlen axillärer Lymphknoten
pN2a	Mindestens eine Metastase > 2 mm
pN2b	Metastasen in klinisch auffälligen ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. bei Fehlen axillärer Lymphknoten
pN3	Metastasen in mind. 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. bei Vorliegen von mind. einem positiven axillären Lymphknoten; oder in mehr als 3 axillären Lymphknoten mit klinisch negativen, mikroskopischen Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria int.; oder in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastasen in mind. 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (mind. einer > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria int. bei Vorliegen von mind. einem positiven axillären Lymphknoten; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten entlang der A. mammaria int. mit mikroskopischen Metastasen, die durch Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch unauffällig
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

Tab.4 pN-Kriterium (nach Wittekind et al. 2002)

Fernmetastasen (pM)	
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tab.5 pM-Kriterium (nach Wittekind et al..2002)

Alle benignen Befunde wurden klinischerseits nicht weiter verfolgt. Bei in-situ-Läsionen erfolgte eine R 0-Resektion mit definiertem Sicherheitsabstand.

Bei allen Befunden mit einer Invasion des Tumors erhielten die Patienten eine brusterhaltende chirurgische Therapie einschließlich Axillaclearance. In den Fällen bei denen Brusterhalt nicht möglich war, wurde eine Ablatio mammae mit axillärer Lymphonodektomie durchgeführt. Die Sentinel-Lymphknotenbiopsie wurde für die Studie ausgeschlossen. Die axilläre Lymphonodektomie umfasste in allen Fällen die Level I und II, mindestens jedoch 10 Lymphknoten (Fisher et al. 1981, Am Soc Clin Oncol. 1998, Somner et al.2004). Die Zahl der befallenen Lymphknoten ging bei der Untersuchung nicht entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation ein. Eine Adaptation erfolgte wie folgend. Der Nodalstatus ohne Lymphknotenbefall wurde als pN0 bewertet, metastatisch befallene Lymphknoten, gleich in welcher Anzahl, wurden als pN1 gewertet.

Eine Aufstellung der Ausbreitungskriterien und des Nodalstatus beinhalteten die Abb. 3 und 4.

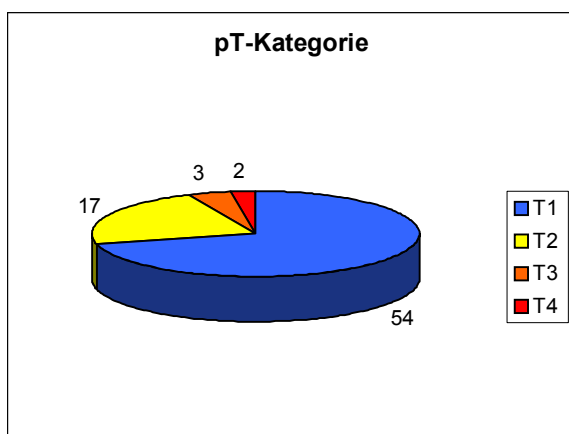


Abb.3 Anzahl der Patienten nach pT-Kategorie

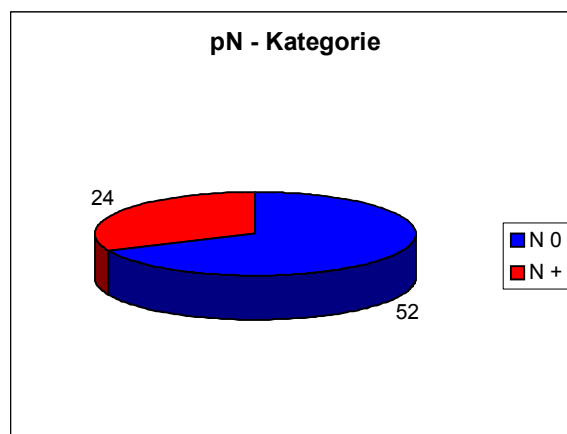


Abb.4 Anzahl der Patienten nach pN-Kategorie

Anschließend wurde die weitere immunhistochemische Aufarbeitung veranlasst.

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Immunhistochemische Technik- (LSAB-Methode)

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Paraffinschnitte von in 4 % Formalin fixiertem Gewebe in der Stärke von 2 – 3 µm angefertigt. Die Einbettung und Entparaffinierung erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Nach der Entparaffinierung erfolgte die spezielle Vorbehandlung für die Immunhistochemie. Dieser Prozess ist wegen des erforderlichen Qualitätsmanagements durch die Firma DakoCytomation standardisiert. Hierfür wurde der ChemMate™ Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse in Kombination mit dem DakoCytomation Autostainer verwendet.

Zunächst wurden die Schnitte für 30 min im Dampfgerar in Target Retrieval Solution (DakoCytomation, Dänemark) bei einem pH-Wert von 6,1 gekocht. Dann erfolgte das Abkühlen für 20 Minuten. Die Blockierung der endogenen Phosphatase erfolgte durch den Zusatz von ChemMate™ Levamisole zum ChemMate™ AP Substrate Buffer vor dem Zufügen von ChemMate™ Chromogene Red 1, Red 2 und Red 3 für jeweils 8 min. Die verwendeten primären Antikörper und deren Verdünnung ist aus Tabelle 6 zu ersehen. Der ChemMate™ Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse basiert auf einer indirekten Streptavidin-Biotin-Methode. Hierbei reagiert das biotinylierte Antikörperreagenz gleich gut mit Kaninchen- und Mausimmunglobulin. Dies erfordert nur die Anwesenheit eines sekundären Reagenz für primäre Kaninchen- und Mausantikörper. Das sekundäre Antikörperreagenz wurde unter Verwendung eines mit 7 Atomen besetzten Spacer-Arms mit Biotin markiert. So ist es möglich, dass jedes biotinylierte Antikörpermolekül mit eigenen an alkalische Phosphatase konjugierten Streptavidinmolekülen reagieren kann. Die angefärbten Gewebeschnitte wurden nach Entnahme aus dem DakoCytomation Autostainer mit einer Gegenfärbung mit DakoCytomation Hematoxin für 20 Sekunden unterzogen, dann Bläuen unter Leitungswasser. Abschließend wurden die Präparate in 70 % Ethanol gespült, über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und in neutralem Kanadabalsam eingedeckt. Die gesamte Aufarbeitung

erfolgte entsprechend dem Protokoll der Firma DakoCytomation (DakoCytomation; 2004).

4.4.2 Primäre Antikörper und histologische Beurteilung der untersuchten Gewebeproben

Die für die Immunhistochemie eingesetzten primären Antikörper sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

Antigen	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle	Referenz
Lymphatisches Endothel	D2-40 monoklonal	1 : 50	Signet, USA	Kahn et al. 2002
LYVE 1 Lymphatisches Endothel	polyklonal	1 : 40	DCS, Hamburg	Banerji S et al. 1999
CD 31	JC70A monoklonal	1: 200	DAKO, Dänemark	Yan et al. 1995
α -glatt- mukuläres Aktin	1A4 monoklonal	1: 300	DAKO, Dänemark	Skalli et al. 1986

Tab. 6 Angewendete Antikörper

Die Diagnosestellung erfolgte jeweils am H&E- gefärbtem Präffinschnitt. Die unmittelbar anschließenden Schnitte des paraffinfixierten Gewebesblockes wurden für die immunhistochemischen Färbungen verwendet.

4.5 Quantitative Bewertung der lymphatischen Mikrogefäßdichte

Die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte wie beschrieben nach Diagnosestellung sowohl bei den benignen als auch bei den malignen Befunden. Anschließend erfolgte die mikroskopische Beurteilung der Präparate in Anlehnung an das von Weidner beschriebene Verfahren (Weidner et al. 1991).

Zunächst wurde im korrespondierenden H&E-Schnitt nochmals die histologische Diagnose geprüft. Anschließend erfolgte die Beurteilung des mit dem Antikörper D2-40 gefärbten Präparates. Hierbei wurde zuerst das Präparat in der Lupenvergrößerung betrachtet und der Bereich mit den meisten angefärbten Lymphgefäßen identifiziert. Dieser wurde als *lymphangiogenic hot-spot* gewertet. Dieser *hot spot* wurde anschließend in einer 200-fachen Vergrößerung eingestellt. Die Auszählung der Lymphgefäße erfolgte im Gegensatz zu dem von Weidner beschriebenen Verfahren in nur einem Sichtfeld. Die beschriebene Prozedur ist auf Grund der differenten Situation bei der Lymphgefäßentstehung zu dem von Weidner beschriebenen Verfahren zum Nachweis der Angiogenese (Weidner et al. 1991; Weidner et al. 1992) adaptiert worden. Die Beurteilung aller Schnitte einer Färbung erfolgte hintereinander. Auffälligkeiten, wie die Anfärbung von nicht dem lymphatischen System zuzuordnenden Strukturen, wurden hierbei ebenfalls miterfasst.

Das Vorgehen mit den LYVE-1 gefärbten Präparaten erfolgte analog. Bei allen Schnitten die keine Anfärbung von Lymphgefäßen in der *region of interest* zeigten, wurde um einen methodologischen Fehler auszuschließen, ein zweiter Schnitt mit der entsprechenden Färbung angefertigt und analog dem oben beschriebenen Procedere beurteilt.

4.6 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung der statistischen Wertigkeit erfolgte die Eingruppierung entsprechend der histologischen Diagnose. In diesen Gruppen wurden jeweils für den Antikörper D 2-40 und LYVE-1 aus den erhobenen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden die Werte zudem mit Hilfe von statistischen Verfahren auf ihre Wertigkeit geprüft. Es wurde davon ausgegangen, dass im vorliegenden Zahlenmaterial keine Normalverteilung besteht. In diesem Fall wäre die Nutzung des t-Test-Verfahrens erforderlich gewesen. Da jedoch in den beiden Gruppen eine gleiche Variabilität vorhanden ist und unverbundene Stichproben vorlagen wurde zum einen ein linear-nichtparametrisches Prüfverfahren angewendet. Zur Anwendung kam der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney.

Dieser Test nutzt Rangplätze und Rangplatzsummen (Harten et al. 1994).

Zusätzlich wurden die gewonnenen Werte mittels des Median-Tests nach Dixon und Mood geprüft, um die Ergebnisse des U-Tests zu unterstreichen. Das hier gewählte Testverfahren ist besonders für relativ kleine Stichproben, wie in der vorliegenden Untersuchung vorhanden, geeignet (Harten et al. 1994). Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die Werteangaben von Mittelwert und Standardabweichung wurden gemäß mathematischer Regeln auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet.

4.7 Verzeichnis der Puffer-und Farblösungen

4.7.1 Häkalaun nach Meyer

- 2,5 g Hämatoxylin
- 0,5 g Natriumjodat
- 125 g Aluminiumkaliumsulfat – Dodecahydrat
- 125 g Chloralhydrat
- 2,5 g Acidum citricum
- auf 2500 ml mit Aqua dest. auffüllen

Der Ansatz wird dann 14 Tage zur Reifung ruhen gelassen.

4.7.2 PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,2 g KH_2PO_4
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

5. Ergebnisse

5.1 Eignung der Antikörper zur Erfassung von Lymphgefäßen in der Mamma

Die Antikörper D2-40 und LYVE-1 wurden auf ihre Anwendbarkeit zur Identifikation von Lymphgefäßen im Brustgewebe geprüft. Die Untersuchung wurde auf die Verteilung von Lymphgefäßen an nichtneoplastisch, das heißt mastopathisch veränderten Gewebeproben durchgeführt.

Die Identifizierung von Lymphgefäßen erfolgte im mastopathisch veränderten Gewebe im H&E-Schnitt aus dem histologischen Kontext heraus. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung mit dem Antikörper gegen CD31 zur Abgrenzung gegen Blutgefäße. Am korrespondierenden immunhistochemisch gefärbten Präparat wurde die Anfärbung der lymphatischen Strukturen mittels der Antikörper D2-40 und LYVE-1 kontrolliert. Abbildung 5 zeigt einen solchen Serienschnitt.

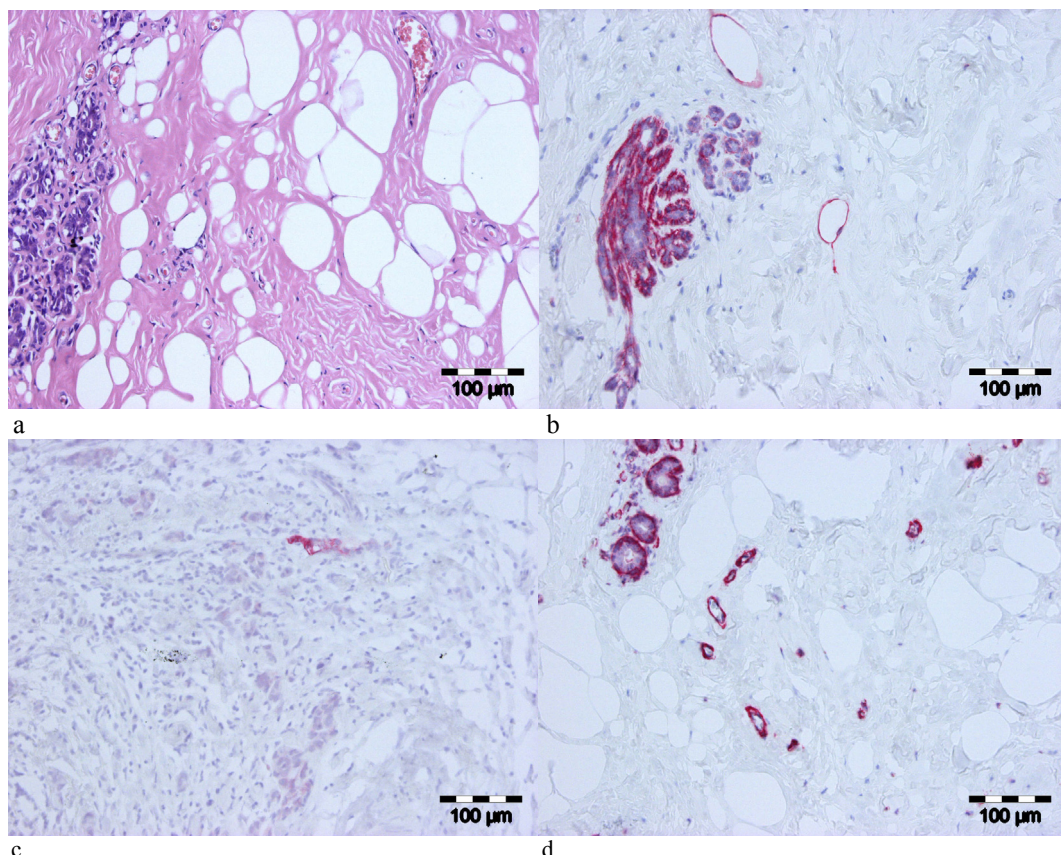


Abb.5 Lymphgefäßdarstellung in nichtneoplastisch verändertem Brustgewebe (Serienschnitt)
a) H&E Färbung b) Immunhistochemie mit Antikörper D2-40 c) Immunhistochemie mit dem Antikörper LYVE-1 d) Immunhistochemie mit dem Antikörper 1A4 zur Darstellung des α -glattmuskulären Aktins

Dabei ließen sich die vorher im H&E-Schnitt dem lymphoendothelialem System zugeordneten Strukturen eindeutig identifizieren.

Im Falle der Invasion von Tumorzellen in Lymphgefäße, konnten diese ohne Schwierigkeiten identifiziert werden. In der Abb.6 wird ein Fall mit lymphangischer Tumordinvasion dargestellt.

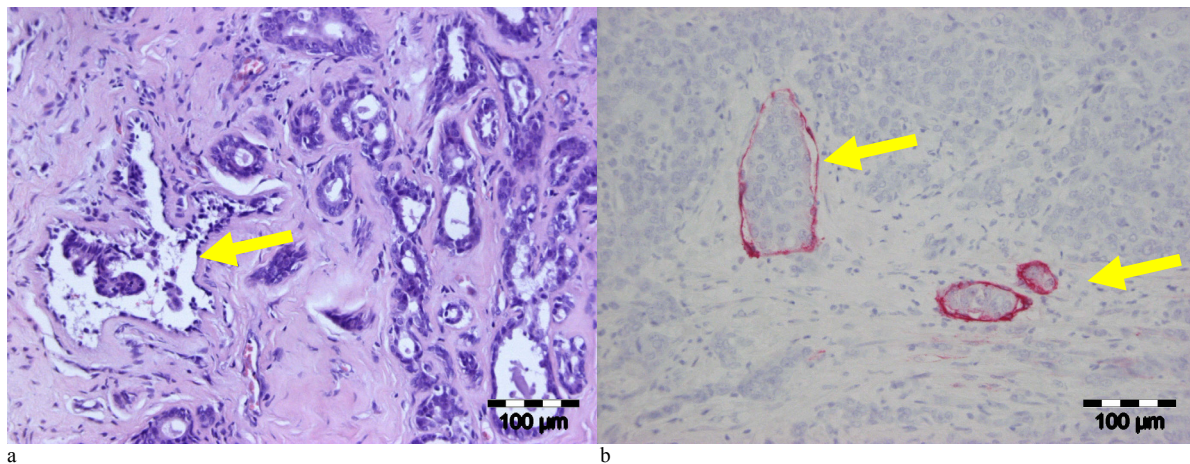


Abb.6 Lymphgefäßdarstellung in invasiv-duktalem Karzinom der Mamma

a) H&E Färbung, b) Immunhistochemie mittels Antikörper D2-40, jeweils Pfeilmarkierung der lymphangischen Karzinosen

Mittels des Antikörpers D2-40 konnten alle Lymphgefäße identifiziert werden, die auch aus dem histologischen Kontext heraus nachzuweisen waren. Im Nachweisverfahren mittels des Antikörpers LYVE-1 war es nicht möglich, alle im H&E-Schnitt und mit D2-40-gefärbten Schnitten gesehenen lymphatischen Strukturen zu identifizieren. Daher muss festgestellt werden, dass LYVE-1 nur einen Teil der Lymphgefäße im Mammaparenchym markiert.

Die Synopsis der Auswertung gestattet die Feststellung, dass es mit der applizierten Methodik möglich ist, die Darstellung von Lymphgefäßen im Brustgewebe mit den Antikörpern D2-40 und LYVE-1 durchzuführen.

5.2 Kreuzreaktionen der Antikörper

5.2.1 Kreuzreaktionen des Antikörpers D2-40 mit nichtlympho-endothelialen Strukturen des Mammaparenchyms und der anhaftenden Dermis

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Mammabioptate zeigte sich neben der Anfärbung der lymphoendothelialen Strukturen auch die Mitreaktion von weiteren nicht-lymphoendothelialen Strukturen.

Ausführungen zur quantitativen Bewertung der markierten und nichtmarkierten lymphoendothelialen Strukturen erfolgen im Kapitel 6.3..

Eine deutliche Mitreaktion ist bei myoepithelialen Strukturen zu beobachten. Diese myoepithelialen Strukturen finden sich als basale Zellen der Milchgänge und Azini. Im Bereich des Brustdrüsenstroma kommt es vor allem zu einer starken Mitreaktion von Myofibroblasten. Der Zelleib der spindeligen Stromazellen mit einem schwach eosinophilem Zytoplasma im H&E-Präparat ist in der D2-40-Immunreaktion kräftig und komplett angefärbt. Die markierten Myofibroblasten sind sowohl als positive Einzelzellen als auch gruppiert, insbesondere in Mastopathieformen mit sklerosierenden Veränderungen im Stroma, erkennbar. Diese Kreuzreaktion ist in der Abbildung 7 dargestellt.

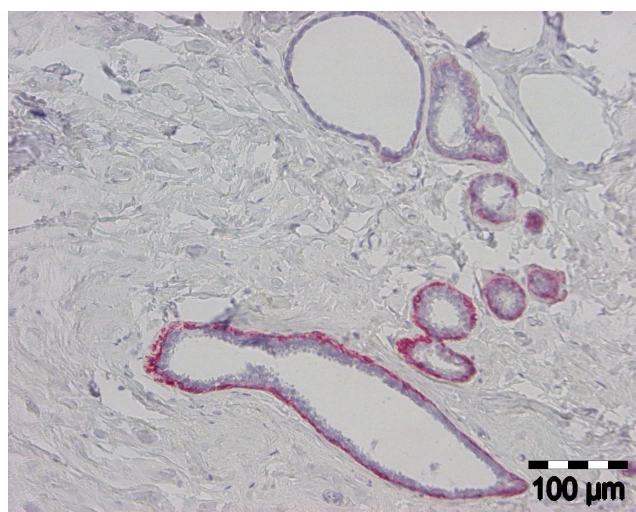


Abb.7 Nichtneoplastisch verändertes (mastopathisches) Brustdrüsengewebe mit positiver Markierung der Myoepithelien (Immunhistochemische Reaktion mit dem Antikörper D2-40)

An einem Teil der Myofibroblasten des Karzinomstroma fällt eine kräftige Markierung mit D2-40 auf. Die Interpretation der Antikörper D2-40-positiven Stromazellen als Myofibroblasten wurde durch eine Markierung des alpha-glattmuskulären Aktin im Serienschnitt, wie in Abbildung 6 ersichtlich, belegt.

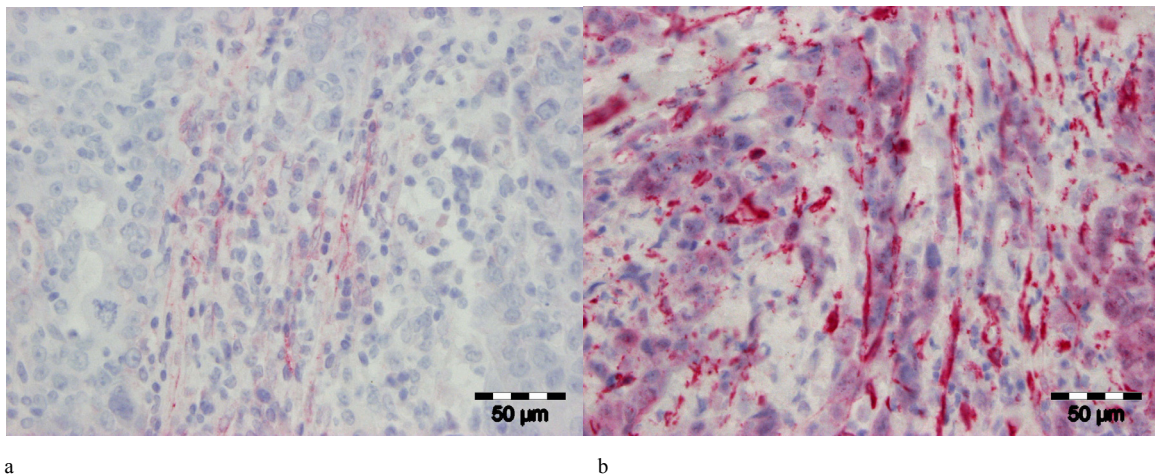


Abb.8 invasiv-duktales Mammakarzinom mit positiver Reaktion der Myofibrblasten am korrespondierenden histologischen Präparat, immunhistochemische Reaktion
a) Antikörper D2-40 b) Antikörper ASMA

Finden sich Strukturen der Epidermis im Mammabioptat, so fällt eine starke Mitreaktion der Basalzellen des Plattenepithels auf. In der Abbildung 9 finden sich im Bereich der anhaftenden Dermis eine Infiltration durch das organotypische invasiv-duktales Karzinom (rechts unten). In der Mitte zeigen sich einige markierte Lymphgefäße, zusätzliche kommt es zu einer falschpositiven Darstellung der Basalzellen der Epidermis.

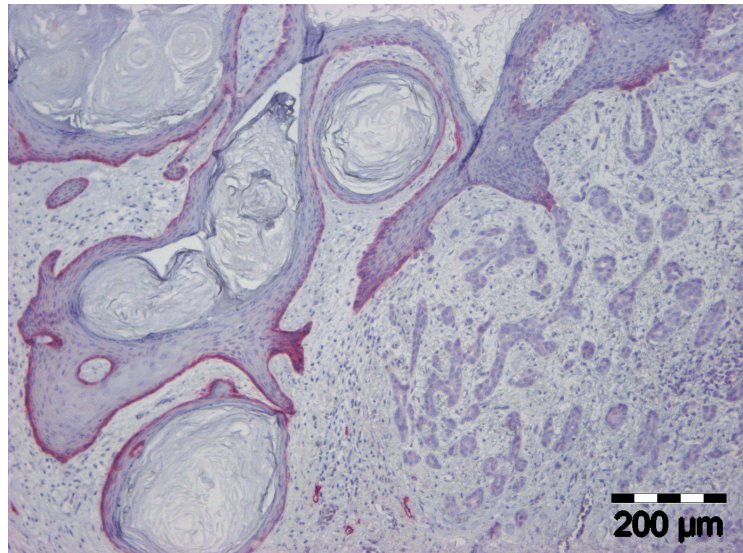


Abb.9 Basale Keratinozytenzellen der Haut falschpositiv markiert, welche durch ein invasiv-duktales Karzinom (rechts unten) infiltriert ist; daneben Darstellung von Lymphgefäße (Immunhistochemischer Serienschnitt mit dem Antikörper D2-40)

In der analysierten Fallstudie war in der Nachbarschaft eines ductalen Carcinoma in situ (DCIS) vom intermediären Typ eine lymphatische Invasion nachweisbar (siehe Abb.10).

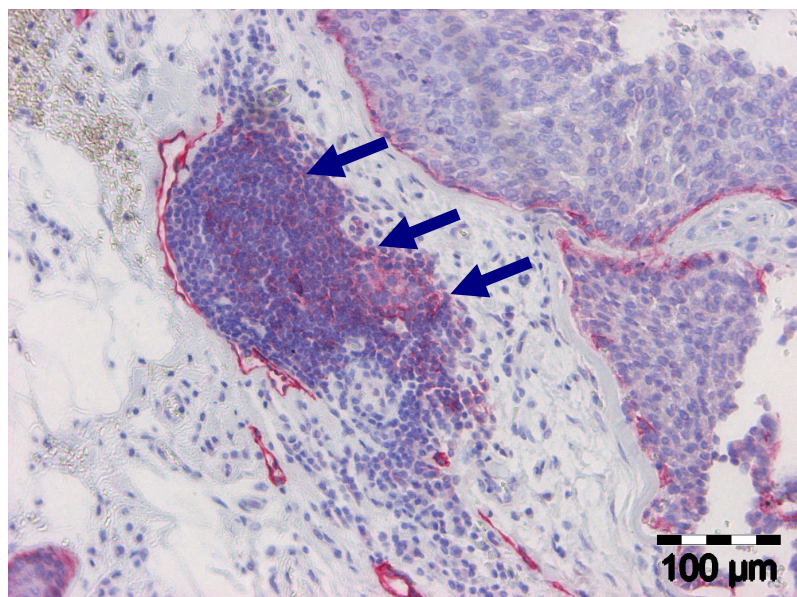


Abb.10 DCIS vom intermediären Grad, in der Nachbarschaft der intraductalen Karzinom-Formationen mit lymphatischen Gewebe; im lymphatischen Gewebe sind positive Einzelzellen sichtbar, die aus dem histologischen Kontext als Retikulumzellen benannt werden (Pfeilmarkierung) immunhistochemische Markierung durch Antikörper D2-40

Im neuformierten lymphatischen Gewebe des DCIS ließ sich eine Kreuzreaktion mit dem Antikörper D2-40 nachweisen. Der Position nach und dem Zellbild entsprechend, werden diese Zellen als Retikulumzellen des lymphatischen Gewebes angesprochen.

5.2.2 Kreuzreaktionen des Antikörpers LYVE-1

Bei der Untersuchung der Mammabioptate mit dem Antikörper LYVE-1 konnte keine Markierung von nichtlymphoendothelialen Strukturen gefunden werden. Kreuzreaktionsmuster in Parallelität zum Antikörper D2-40 findet sich im korrespondierenden Serienschnitt bei LYVE-1 nicht.

5.3 Analyse der Lymphgefäßdichte

5.3.1 Lymphgefäßdichte in mastopathischen Brustdrüsengewebe

In den untersuchten Proben erfolgte der Einschluß von 9 nichtneoplastisch (mastopathisch) veränderten Mammabioptaten. Die Lymphgefäße ließen sich im histologischen Kontext und in der Immunreaktion mit beiden Antikörpern markieren. Obwohl histologische Serienschnitte erfasst wurden ist die Anzahl der nachgewiesenen Lymphgefäße different. Eine Aufstellung der bei der wie im Kapitel 4.5. beschriebenen mikroskopischen Untersuchung gewonnen Ergebnisse enthält Tabelle 7.

Studien-Nummer	Histologische Diagnose	Alter (Jahre)	D2-40	LYVE-1
3	Mastopathie	74	1	4
44	Mastopathie	48	1	5
45	Mastopathie	56	2	3
47	Mastopathie	58	2	1
55	Mastopathie	68	4	2
56	Mastopathie	73	2	5
64	Mastopathie	47	3	6
80	Mastopathie	72	7	8
87	Mastopathie	38	4	2

Tab. 7 Aufstellung der Lymphgefäße pro Standardfeld in mastopathischem Gewebe

Die graphische Darstellung der bei der Untersuchung gewonnenen Ergebnisse unter Erfassung des Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgt in der Diagramm 1. Die Abbildung 11 zeigt ein entsprechendes histologisches Präparat im Serienschritt.

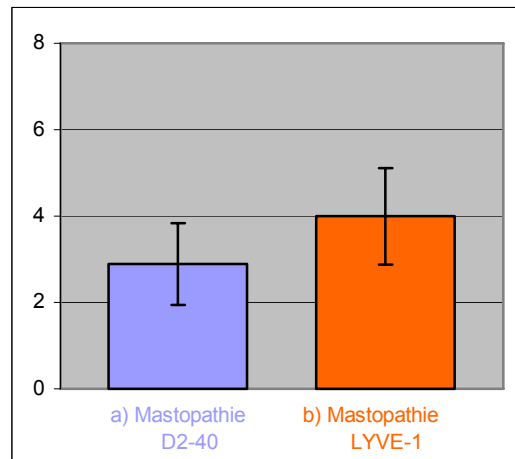


Diagramm 1 Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei Mastopathie
a) Mastopathie-Antikörper D2-40 (Mittelwert 2,89; Standardabweichung $\pm 0,95$)
b) Mastopathie-Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,00; Standardabweichung $\pm 1,00$)

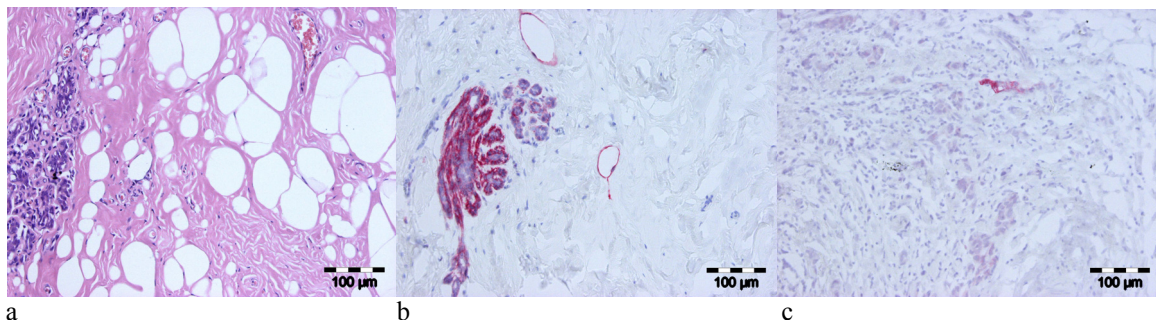


Abb.11 histologisches Präparat eines mastopathischen Gewebsareals (Serienschritt) mit Nachweis von Lymphgefäßen a) H&E, b) Immunhistochemie D2-40, c) Immunhistochemie LYVE-1

5.3.2 Lymphgefäßdichte in Fibroadenomen und Phylloides Tumoren

In die Fallstudie wurden insgesamt 12 Fibroadenome und ein Phylloides Tumor einbezogen. Eine Aufstellung der Untersuchungsergebnisse findet sich in der Tabelle 8.

Überraschenderweise konnten keine Lymphgefäße in den Fibroadenomen nachgewiesen werden. Die Abbildung 12 zeigt ein entsprechendes histologisches Präparat auch in der Immunhistochemie mit dem Antikörper D2-40.

Studien- Nummer	Histologische Diagnose	Alter (Jahre)	D2-40	LYVE-1
5	Fibroadenom	45	0	0
11	Fibroadenom	73	0	0
41	Fibroadenom	36	0	0
43	Fibroadenom	19	0	0
46	Fibroadenom	32	0	0
53	Fibroadenom	16	0	0
54	Fibroadenom	19	0	0
57	Fibroadenom	64	0	0
66	Fibroadenom	47	0	0
86	Fibroadenom	55	0	0
89	Fibroadenom	39	0	0
92	Fibroadenom	65	0	0
99	Phylloides tumor	40	5	5

Tab. 8 Aufstellung der Lymphgefäße pro mikroskopischem Standardfeld in Fibroadenomen und Phylloides tumor

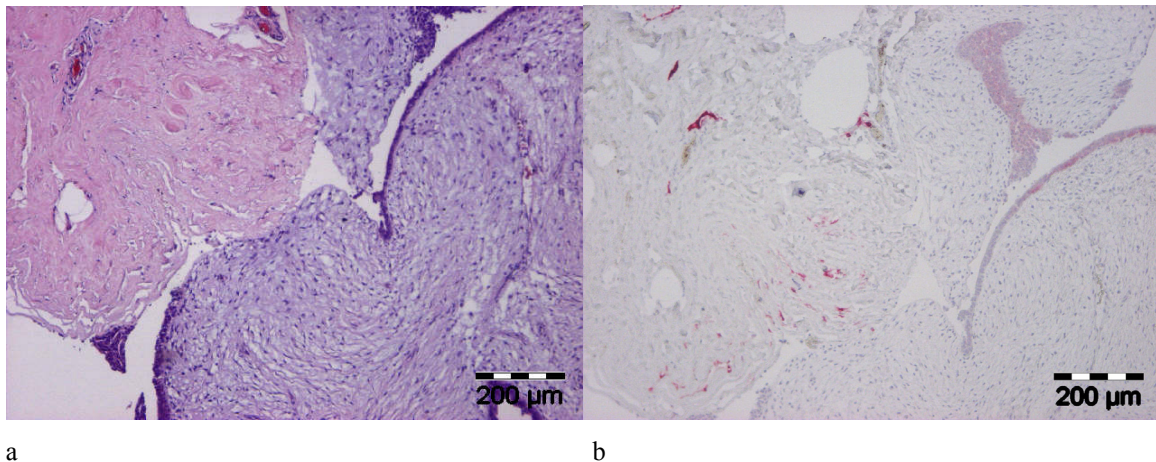
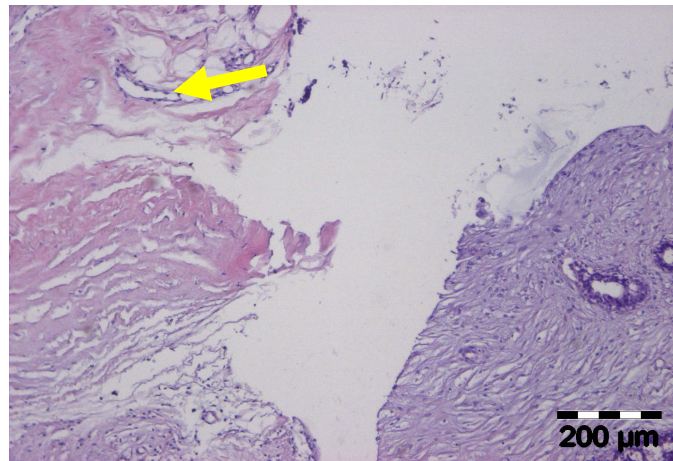
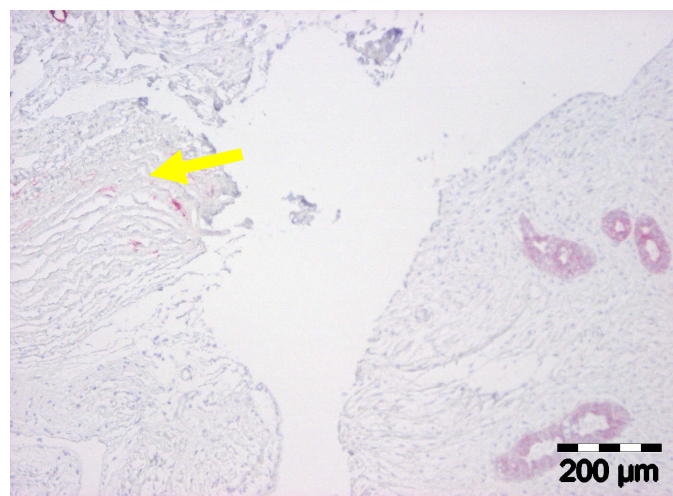


Abb.12 Korrespondierendes histologisches Präparat eines Fibroadenoms der Mamma ohne Nachweis von Lymphgefäßen a) H&E-Färbung, b) Immunhistochemische Reaktion mit dem Antikörper D2-40

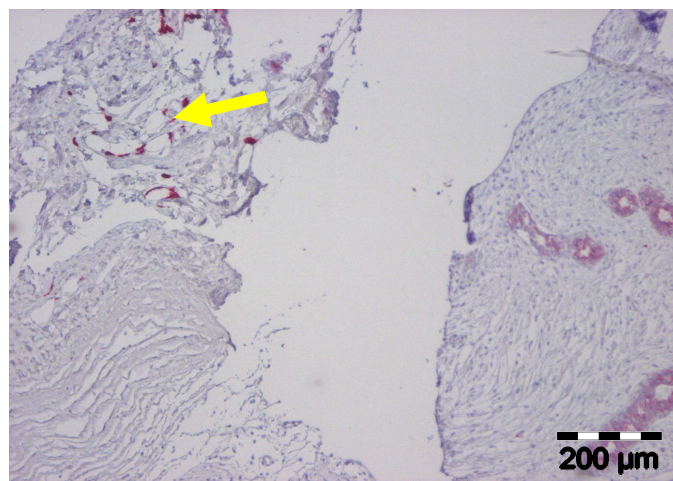
Ein Nachweis von lymphoendothelialen Strukturen die sowohl D2-40, als auch LYVE-1 exprimieren, ist im vorbestehenden Mammagewebe der Umgebung von Fibroadenomen jedoch möglich (Darstellung in Abb. 13). Im Gegenteil dazu findet sich bei expansivem Wachstum eine Verdichtung der Lymphgefäße in der Tumorperipherie.



a



b



c

Abb.13 korrespondierendes histologisches Präparat Fettgewebe der Mamma mit Nachweis von Lymphgefäßen neben einem Fibroadenom a) H&E, b) Immunhistochemie D2-40, c) Immunhistochemie LYVE-1

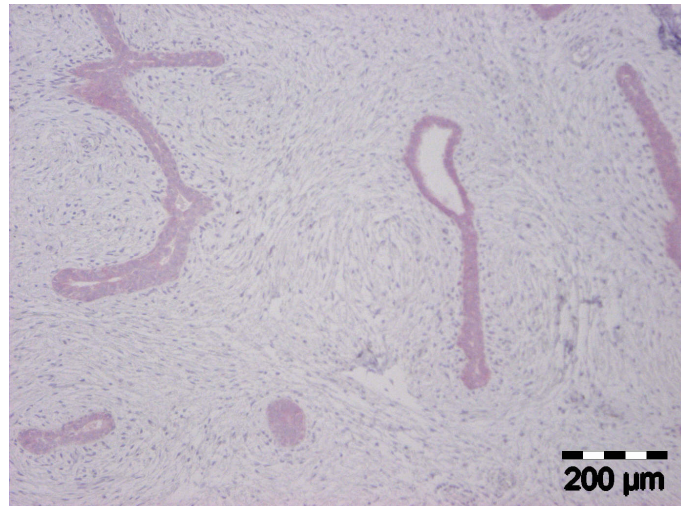


Abb.14 Darstellung eines Fibroadenoms im Zentrum ohne Nachweis von lymphoendothelialen Strukturen Immunhistochemie mit D2-40

Wie in Abbildung 14 dargestellt konnten zentral in Fibroadenomen keine Lymphgefäße gefunden werden. Der untersuchte Phylloides-tumor war, wie in der Abb.15 dargestellt, mit Lymphgefäßen ausgestattet.

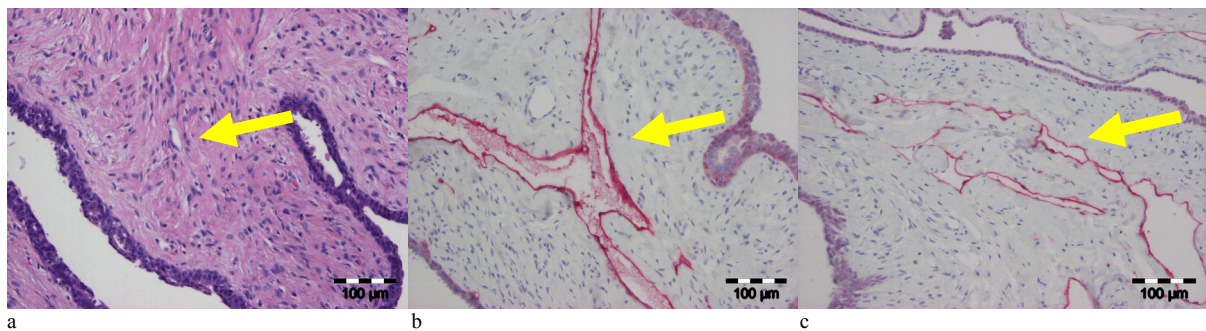


Abb.15 Korrespondierendes histologisches Präparat eines Phylloides-Tumors mit Nachweis von Lymphgefäßen a) H&E, b) Immunhistochemie D2-40, c) Immunhistochemie LYVE-1)

In dem Fall eines auf ein Fibroadenom beschränkten lobulär-invasiven Mammakarzinoms konnten in dem im Fibroadenom befindlichen Karzinom ebenfalls keine lymphoendothelialen Strukturen nachgewiesen werden (siehe Abb. 16 und 17).

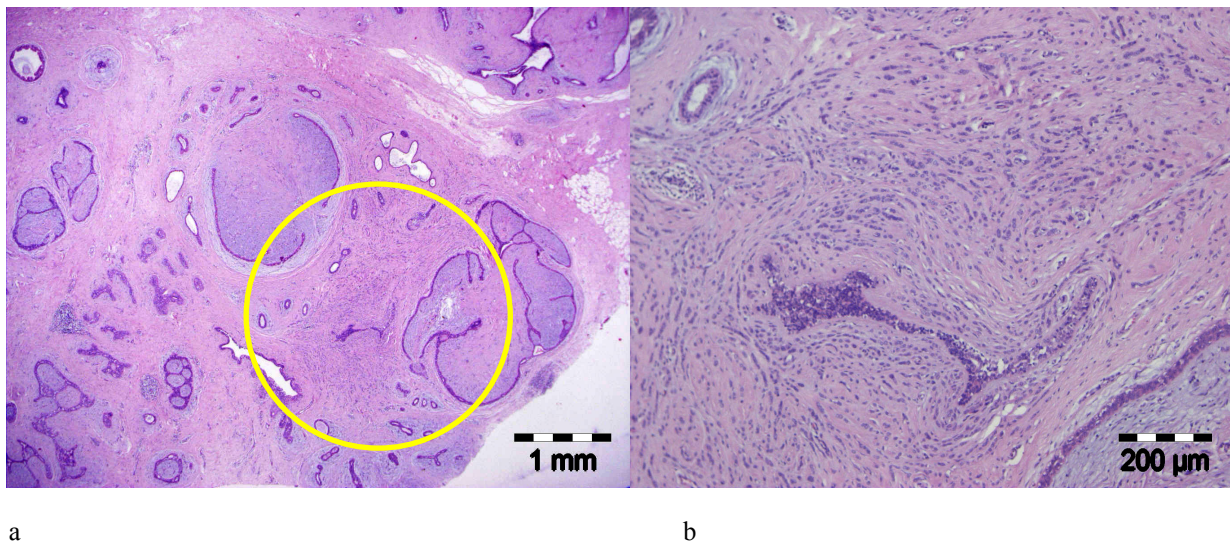


Abb.16 Fibroadenom mit einem invasivem Karzinom, kreismarkiert (H&E-Färbung)

a) Übersichtsaufnahme, b) Detailaufnahme des Fibroadenoms mit invasivem Karzinom, zur Darstellung kommt die gänsemarschartige Anordnung der Karzinomzellen, welche typisch für ein invasiv-lobuläres Karzinom ist.

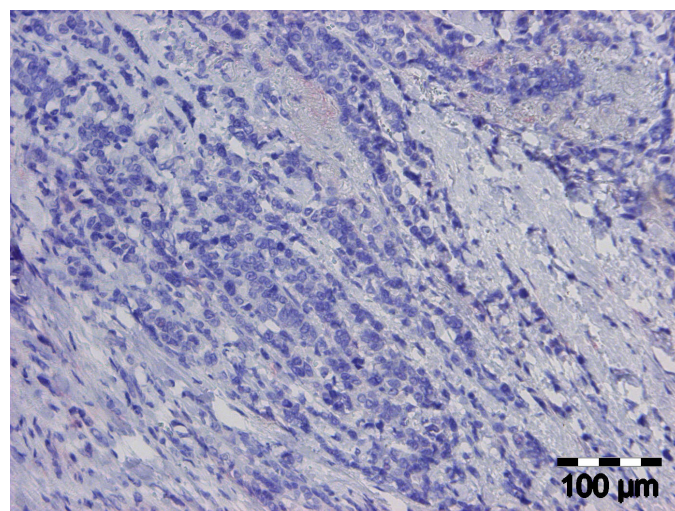
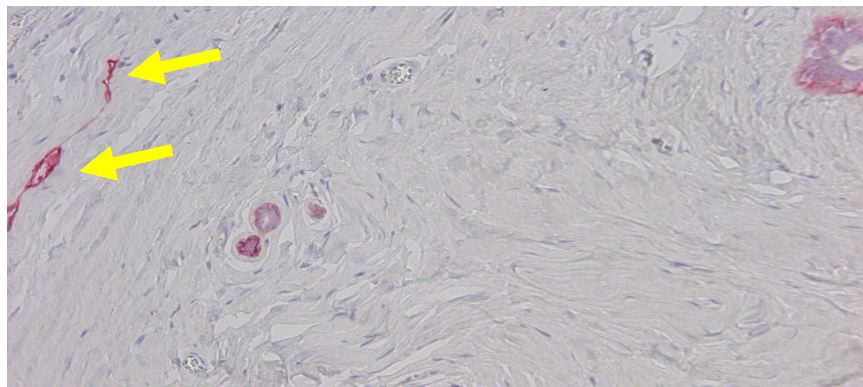
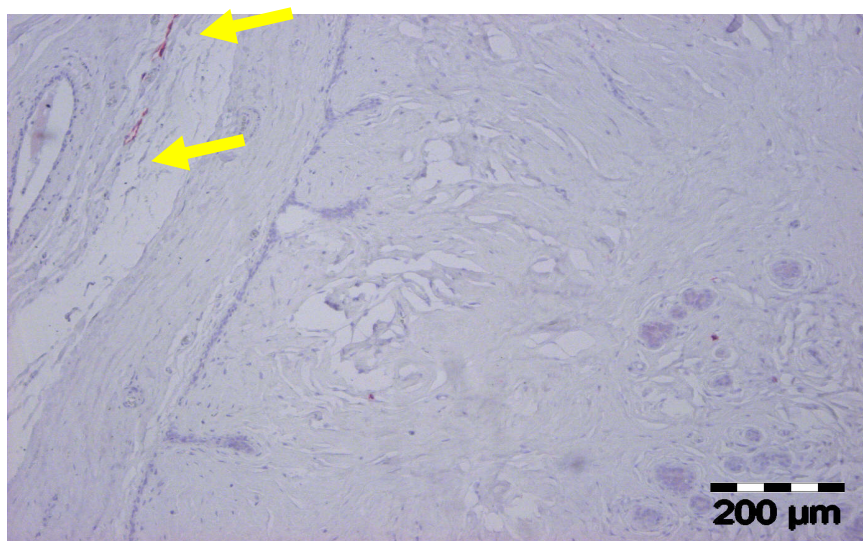


Abb .17 Detailaufnahme des invasiv-lobulären Karzinoms im Fibroadenom ohne Nachweis von lymphoendothelialen Strukturen (Immunhistochemie mit dem Antikörper D2-40)

Gleichwohl finden sich auch in der Peripherie des Fibroadenoms mit invasiv-lobulärem Karzinom lymphoendotheliale Strukturen. Diese wurden in der Abbildung 18 durch Pfeilmarkierung hervorgehoben.



a



b

Abb.18 Darstellung eines Fibroadenoms mit umgebendem Fettgewebe immunhistochemischer isolierter Nachweis von Lymphgefäßen im umgebenden Gewebe, Pfeilmarkierung
Immunhistochemie a) Antikörper D2-40, b) Antikörper LYVE-1

5.3.3 *Lymphgefäßverteilung in Assoziation zu intraduktalen Neoplasien*

In die Studie wurden drei ductale Carcinoma in situ (DCIS) und ein Milchgangspapillom als intraduktale Neoplasie eingeschlossen und betrachtet. Bei den in die Untersuchung eingeflossenen DCIS und dem untersuchten

Milchgangspapillom zeigte sich ein ungleichmäßiges Anfärbungsverhalten beider Antikörper (Abbildung 20 und 21). Die quantitative Bewertung ist in Tabelle 9 aufgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte in Diagramm 2.

Studien-Nummer	Histologische Diagnose	Stadium			Alter (Jahre)	D2-40	LYVE-1
		pTis	cN0	cM0			
4	DCIS	pTis	cN0	cM0	55	1	4
60	Milchgangpapillom	PT0	cN0	cM0	54	3	9
77	DCIS	pTis	cN0	cM0	62	4	4
93	DCIS	pTis	cN0	cM0	63	3	2

Tab. 9 Aufstellung der Lymphgefäße pro Standardfeld in intraduktalen Neoplasien

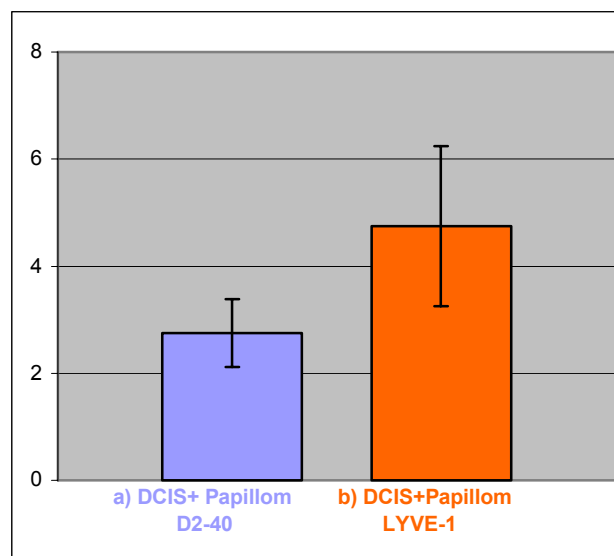


Diagramm 2 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* im DCIS und Milchgangspapillom a) DCIS und Phylloides-tumor-Antikörper D2-40 (Mittelwert 2,75 ; Standardabweichung $\pm 0,63$) b) DCIS und Phylloides-tumor-Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,75; Standardabweichung $\pm 1,49$)

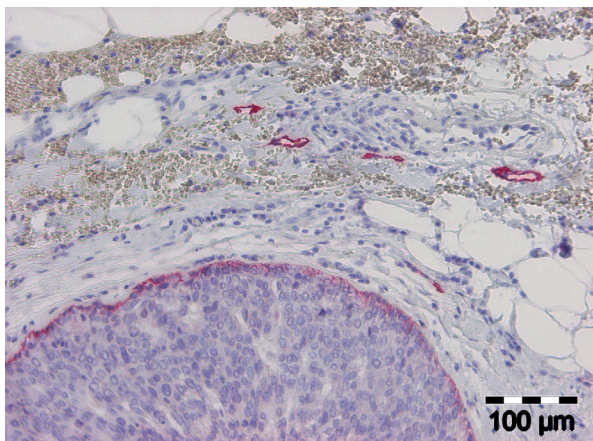


Abb. 20 Lymphgefäßdarstellung bei einem DCIS intermediären Typ (Immunhistochemie mit dem Antikörper D2-40)

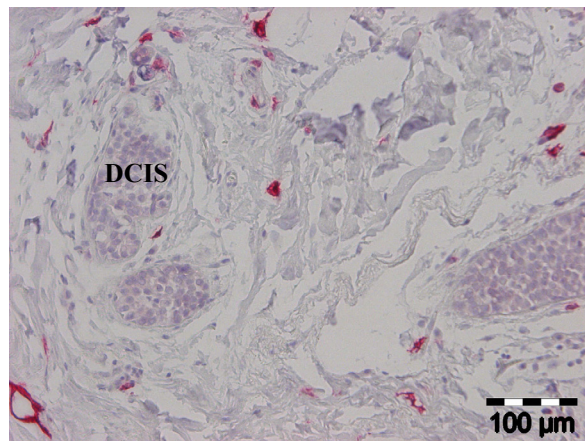


Abb. 21 Lymphgefäßdarstellung bei einem lowgrade DCIS (Immunhistochemie mit dem Antikörper LYVE-1)

5.3.4 Lymphgefäßdichte im invasiv-duktalem Mammarkarzinom

Die Dichte der lymphatischen Gefäße wurde ebenfalls entsprechend der in Kapitel 4.5. beschriebenen Methodik bestimmt. Die Untersuchung erfolgte an 50 invasiv-duktalem Karzinomen. Die Aufstellung der Ergebnisse der Analyse findet sich in der Tabelle 10. Auffällig war, dass bei Anhäufung von Lymphgefäßen, diese eher im Bereich der Tumorperipherie als im Tumorzentrum zu sehen waren (Abbildungen 22 und 23). Es wurden hierbei auch Ausnahmen beobachtet. Eine 2. Beurteilung der Lymphgefäßanzahl erfolgte bei einem unerwarteten Ergebnis an einem zweiten neu angefertigten histologischen Präparat. Dieses wurde aus unmittelbarer Nähe des ersten Schnittes dem Parafinblock entnommen.

Studien Nummer	Histologische Diagnose	Stadium			Alter (Jahre)	D2-40	LYVE-1	
		.					1. Beurt.	2 . Beurt.
1	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	71	7	0	
6	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	45	1	1	
7	inv.-dukt. Karzinom	pT1	pN1	cM0	48	11	3	
8	inv.-dukt. Karzinom	pT1	pN1	cM0	81	11	4	
10	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	48	11	8	
13	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	56	3	7	
15	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	80	15	6	

16	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	65	13	11	
17	inv.-dukt. Karzinom	pT1	pN1	cM0	70	3	1	1
18	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	68	7	4	
19	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	77	6	3	
20	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	71	4	2	
21	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	64	0	2	
23	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	51	3	2	
24	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	33	12	8	
25	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	43	4	3	
26	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	44	5	2	
27	inv.-dukt. Karzinom	pT1a	pN0	cM0	53	7	3	
31	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	59	4	2	
32	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN1	cM0	76	5	7	
33	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	74	8	4	
36	inv.-dukt. Karzinom	pT3	pN1	cM0	66	6	0	0
37	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	85	3	2	
38	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN1	cM0	41	6	3	3
39	inv.-dukt. Karzinom	pT4	pN1	cM0	66	8	6	
48	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN1	cM0	58	3	8	
49	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	62	0	8	
50	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	53	0	0	0
51	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	62	3	2	
52	inv.-dukt. Karzinom	pT1	pN0	cM0	52	18	4	
59	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN1	cM0	35	11	7	
62	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	51	4	0	0
65	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	80	7	0	0
68	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	61	7	0	0
69	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	43	5	2	2
70	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	68	8	0	
72	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	65	8	9	
74	inv.-dukt. Karzinom	pT3	pN1	cM0	63	11	3	
75	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	68	18	2	
81	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	52	6	4	
83	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	54	4	7	
85	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	41	10	7	
88	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	76	3	4	
90	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	73	5	4	
91	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	81	8	0	0
95	inv.-dukt. Karzinom	pT1b	pN0	cM0	74	8	3	
96	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN0	cM0	60	9	6	
97	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN0	cM0	82	1	4	
98	inv.-dukt. Karzinom	pT2	pN1	cM0	68	6	4	
101	inv.-dukt. Karzinom	pT1c	pN1	cM0	44	16	3	

Tab. 10 Aufstellung der Lymphgefäße pro mikroskopischem Standardfeld in invasiv-duktalem Karzinomen, der Antikörper LYVE-1 z.T. mit 2. Beurteilung zur Kontrolle des Ergebnisses

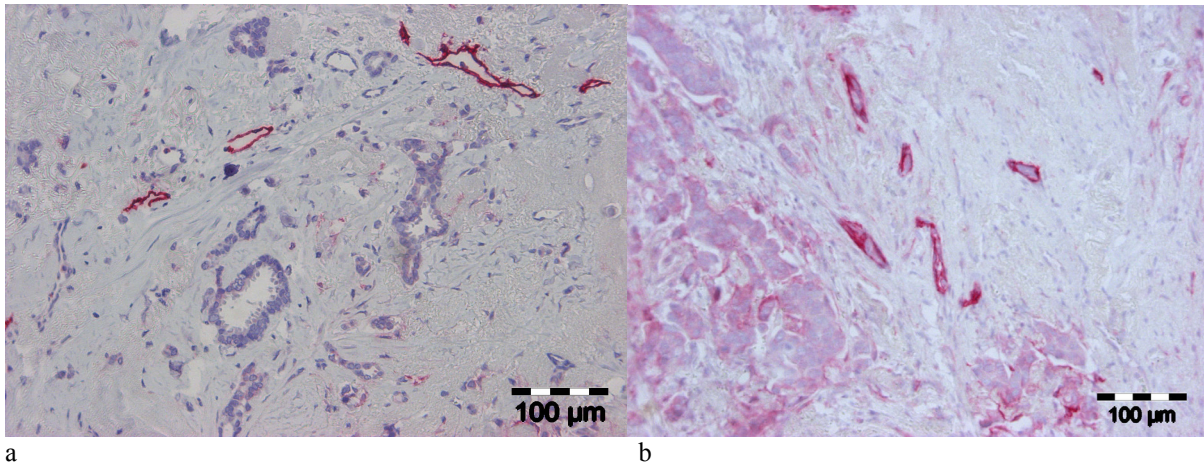


Abb. 22 Darstellung eines invasiv-duktales Karzinoms mit deutlicher Markierung der Lymphgefäße
a) zentral; b) peripher Immunhistochemie mit dem Antikörper D2-40

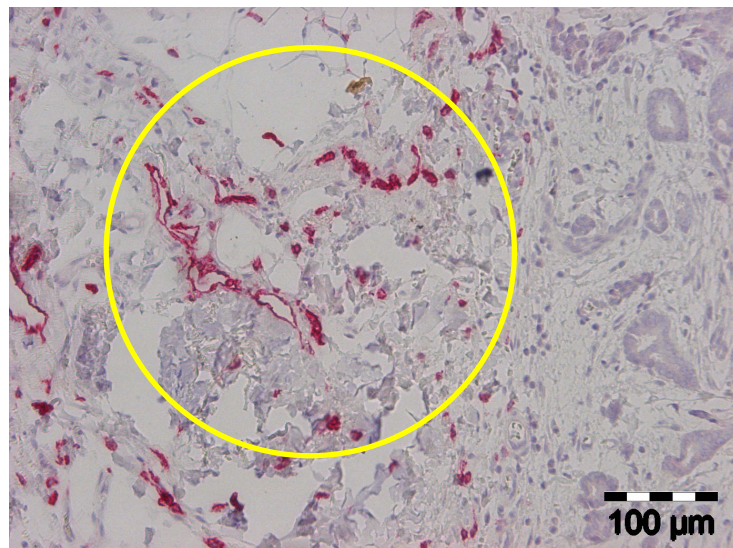


Abb. 23 Darstellung eines lymphangischen *hotspot* (Kreismarkierung) in einem invasiv-duktales Karzinom G2 (Immunhistochemie mit dem Antikörper LYVE-1)

5.3.5 Lymphgefäßdichte im invasiv-lobulären Karzinom der Mamma

Die Verteilung der Lymphgefäßdichte beim invasiv-lobulären Karzinom zeigt die Tabelle 11. In die Untersuchung wurde die Auswertung von insgesamt 18 invasiv-lobulären Karzinomen einbezogen.

Im Fall des fehlenden Nachweises von Lymphgefäßen wurde zur Absicherung der Methodik ein zweiter Schnitt angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Das

Ergebnis der Auswertung wurde gesondert aufgeführt. Nur beim Antikörper LYVE-1 war dieses Vorgehen notwendig.

Studien- Nummer	Histologische Diagnose	Stadium			Alter (Jahre)	D2- 40	LYVE-1	
							1. Beurt.	2 . Beurt.
2	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN1	cM0	50	9	0	0
9	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	39	6	3	
14	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	64	7	9	
22	inv.-lobuläres Karzinom	pT2	pN0	cM0	70	6	3	
28	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN1	cM0	61	10	0	0
29	inv.-lobuläres Karzinom im Fibroadenom	pT1a	pN0	cM0	45	0	0	0
30	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	72	0	8	
34	inv.-lobuläres Karzinom	pT2	pN0	cM0	70	6	6	
35	inv.-lobuläres Karzinom	pT1b	pN0	cM0	54	4	9	
67	inv.-lobuläres Karzinom	pT1b	pN0	cM0	69	3	0	0
71	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	59	14	8	0
73	inv.-lobuläres Karzinom	PT1c	PN0	cM0	69	13	3	
76	inv.-lobuläres Karzinom	pT4	pN1	cM0	55	10	3	
78	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	55	7	6	
82	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN0	cM0	69	8	5	
84	inv.-lobuläres Karzinom	pT2	pN1	cM0	75	7	7	
94	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN1	cM0	45	12	9	
102	inv.-lobuläres Karzinom	pT1c	pN1	cM0	81	9	6	

Tab. 11 Aufstellung der Lymphgefäße pro mikroskopischem Standardfeld in invasiv-lobulären Karzinomen Antikörper LYVE-1 z.T. mit 2. Beurteilung zur Kontrolle des Ergebnisses

5.3.6 Lymphgefäßdichte in Mammakarzinomtypen, nicht als duktal oder lobulär klassifiziert

Alle als nicht-invasiv-duktral und nicht-invasiv-lobulär klassifizierten Mammakarzinome wurden entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation in einer eigenen Gruppe zusammengefasst und betrachtet. Insgesamt wurden in dieser Gruppe 8 Karzinome analysiert. Die Auswertung findet sich in Tabelle 12.

Studien- Nummer	Histologische Diagnose	Stadium			Alter (Jahre)	D2-40	LYVE-1	
							1. Beurt.	2. Beurt.
12	tubuläres Ca	pT1c	pN0	cM0	69	10	7	
63	tubuläres Ca	pT1c	pN0	cM0	52	6	0	0
79	tubuläres Ca	pT1b	pN0	cM0	81	6	11	
58	meduläres Ca	pT3	pN0	cM0	48	6	10	
61	meduläres Ca	pT1c	pN0	cM0	54	8	5	
40	apokrines Ca	pT2	pN0	cM0	89	6	0	0
42	intrazyst-pap. Ca	pT2	pN0	cM0	79	1	3	
100	inv-papiläres Ca	pT1b	pN0	cM0	74	6	3	

Tab. 12 Aufstellung der Lymphgefäße pro mikroskopischem Standardfeld in Karzinomen nicht als duktal, nicht als lobulär klassifiziert, Antikörper LYVE-1 z.T. mit 2. Beurteilung zur Kontrolle des Ergebnisses

5.4 Lokalisation der Lymphgefäße in malignen Läsionen der Mamma

Bei der Beurteilung der Lymphgefäßdichte war auffällig, dass keine gleichmäßige Verteilung der lymphatischen Strukturen vorliegt. Die *hot spots* zeigten sich vor allem in der Tumorperipherie. Wie in den vorstehenden Kapiteln beschrieben, ließen sich nicht in allen Fällen von Neoplasien der Mamma lymphgefäßdichte Bezirke nachweisen. Daher machte sich eine Adaptation des Auswertungsprocedere erforderlich. Entgegen dem Vorgehen von Weidner wurde daher nur ein Gesichtsfeld in 200-facher Vergrößerung in die Betrachtung und Auswertung einbezogen.

5.5 Ergebnisse der quantitativen Bewertung der lymphatischen Mikrogefäßsdichte in Relation zur pT/pN-Kategorie in Läsionen der Mamma

Wie unter Kapitel 4.7. beschrieben wurde entsprechend der histologischen Diagnose und der pT/pN-Kategorie die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen durchgeführt. Die graphische Darstellung entsprechend Tumorstadium und Nodalstatus erfolgt in den Diagrammen 3 bis 7.

pT1a pN0 /pT1b pN0

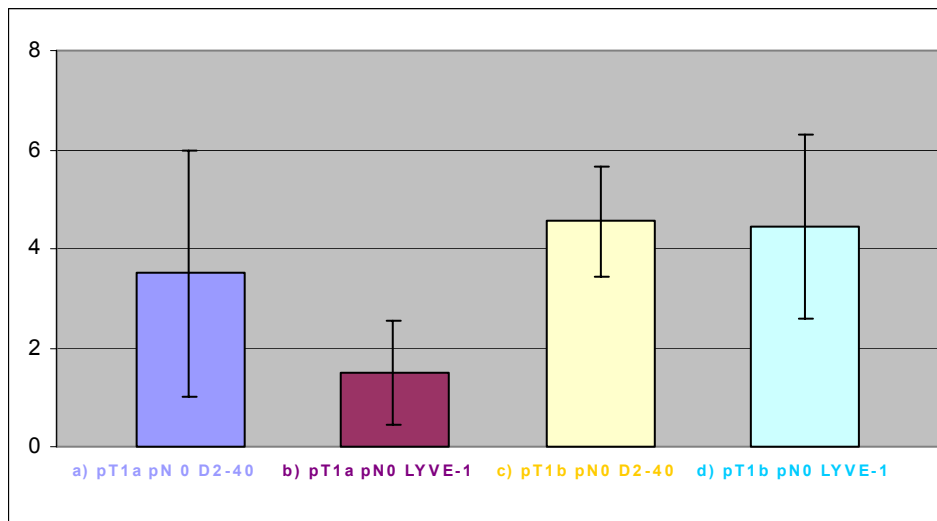


Diagramm 3 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei pT1a pN0/ pT1b pN0

- a) Antikörper D2-40 (Mittelwert 3,5 ; Standardabweichung $\pm 2,48$)
- b) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 1,50 ; Standardabweichung $\pm 1,06$)
- c) Antikörper D2-40 (Mittelwert 4,55 ; Standardabweichung $\pm 1,11$)
- d) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,45 ; Standardabweichung $\pm 1,86$)

pT1c pN0/pT1c pN1

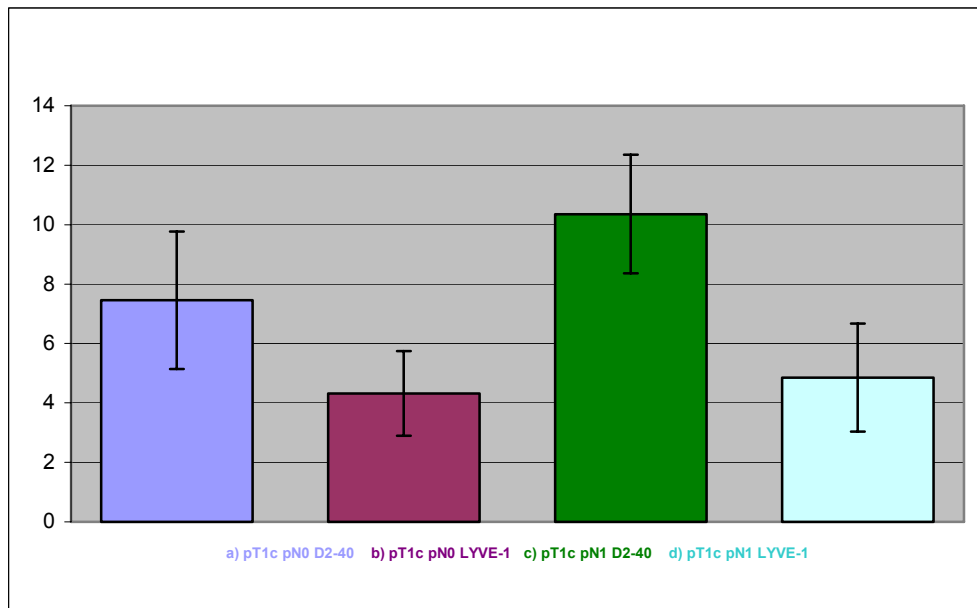


Diagramm 4 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei pT1c pN0/ pT1c pN1

- a) Antikörper D2-40 (Mittelwert 7,45 ; Standardabweichung $\pm 2,32$)
- b) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,32; Standardabweichung $\pm 1,43$)
- c) Antikörper D2-40 (Mittelwert 10,36; Standardabweichung $\pm 2,00$)
- d) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,86; Standardabweichung $\pm 1,82$)

alle pT1 pN0/1

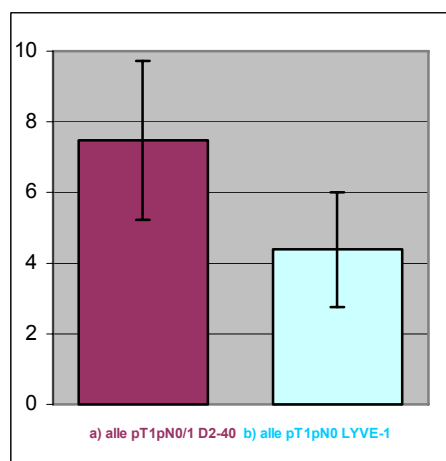


Diagramm 5 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei allen pT1cpN0/1

- a) Antikörper D2-40 (Mittelwert 7,47; Standardabweichung $\pm 2,25$)
- b) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 4,39; Standardabweichung $\pm 1,63$)

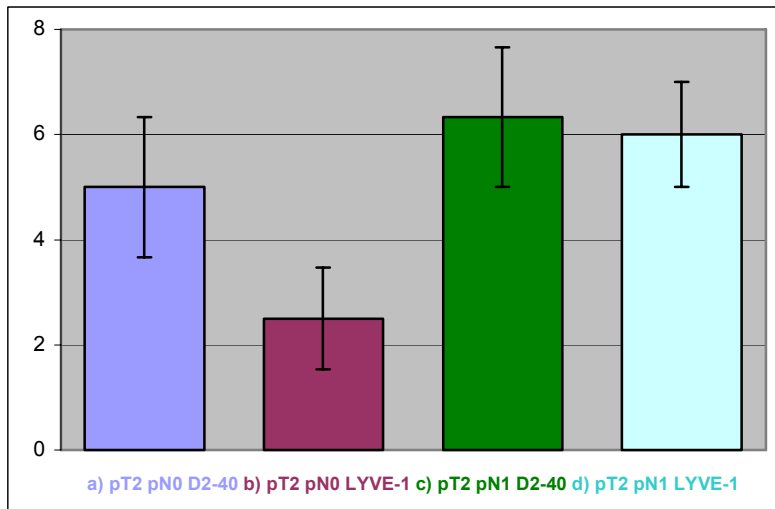
pT2 pN0 /pT2 pN1

Diagramm 6 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei pT2 pN0/pN1

- a) Antikörper D2-40 (Mittelwert 5; Standardabweichung $\pm 1,33$)
- b) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 2,5; Standardabweichung $\pm 0,97$)
- c) Antikörper D2-40 (Mittelwert 6,33 ; Standardabweichung $\pm 1,33$)
- d) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 6; Standardabweichung $\pm 1,00$)

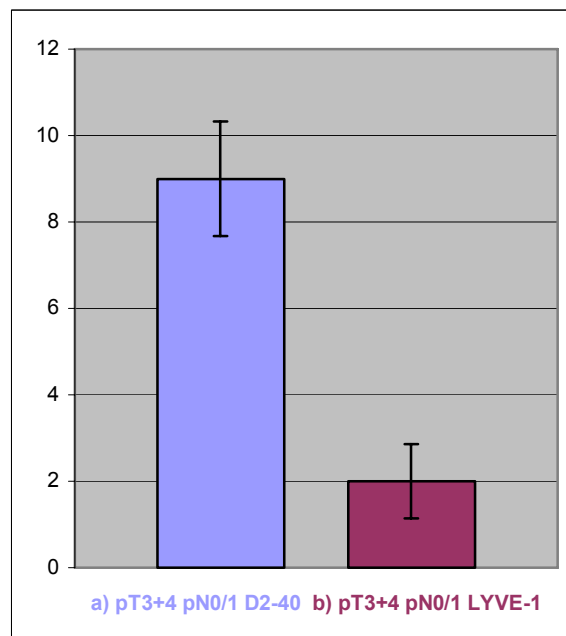
pT3+4 pN0/1

Diagramm 7 graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* bei allen pT3+4 pN0/1

- a) Antikörper D2-40 (Mittelwert 9; Standardabweichung $\pm 1,32$)
- b) Antikörper LYVE-1 (Mittelwert 2; Standardabweichung $\pm 0,87$)

Die statistische Testung auf eine Signifikanz der erhobenen Messwerte wurde mittels des U-Tests nach Wilcoxon, Mann und Whitney und des Median-Tests nach Dixon und Mood durchgeführt. Hierzu erfolgte eine Gruppenbildung analog der Eingruppierung der histologischen Diagnose.

Die zur statistischen Vergleichsprüfung gebildeten Gruppen bestanden aus

Mastopathie versus DCIS

pT1c pN0 versus pT1c pN1

pT2 pN0 versus pT2 pN1

Mastopathie versus pT1-4 pN0/1

Mastopathie versus pT1a-c pN0/1.

Der Vergleich zwischen den möglichen Gruppen pT1-4/N0 und pT1-4/N1 wurde nicht durchgeführt um einen stadiengerechten, onkologisch sicheren Vergleich führen zu können. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils für den Antikörper D2-40 und LYVE-1. Die Ergebnisse sind im Kapitel 5.6.1 zusammengefasst.

5.6 Ergebnisse der statistischen Bewertung

5.6.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus DCIS und Milchgangspapillom als intraductale Proliferationen

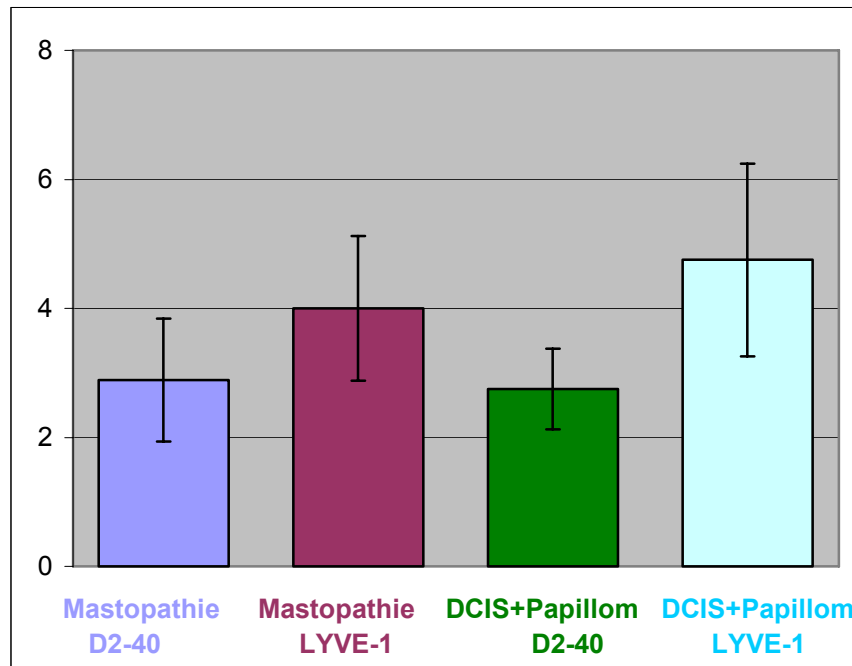


Diagramm 8 vergleichende graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphphangiogenic hotspot* in nicht-neoplastisch verändertem Gewebe im Vergleich zu DCIS und Papillom der Mamma für die Antikörper D2-40 und LYVE-1

Sowohl für den Antikörper D2-40 als auch für den Antikörper LYVE-1 konnten beim statistischen Vergleich der Ergebnisse beider getesteter Antikörper mittels der Testverfahren keine signifikanten Unterschiede zwischen nichtneoplastisch verändertem Gewebe und der Lymphgefäßanzahl in intraduktalen Proliferationen (DCIS und Milchgangspapillom) ermittelt werden (Antikörper D2-40: Wilcoxon-Scorewerte 1,00; Median-Scorewerte 0,5233/Antikörper LYVE-1 Wilcoxon-Scorewerte 0,7071; Median-Scorewerte 0,8094)

Insgesamt zeigte sich eine geringe Streubreite (Diagramm 8).

5.6.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung pT1c pN0 versus pT1c pN1

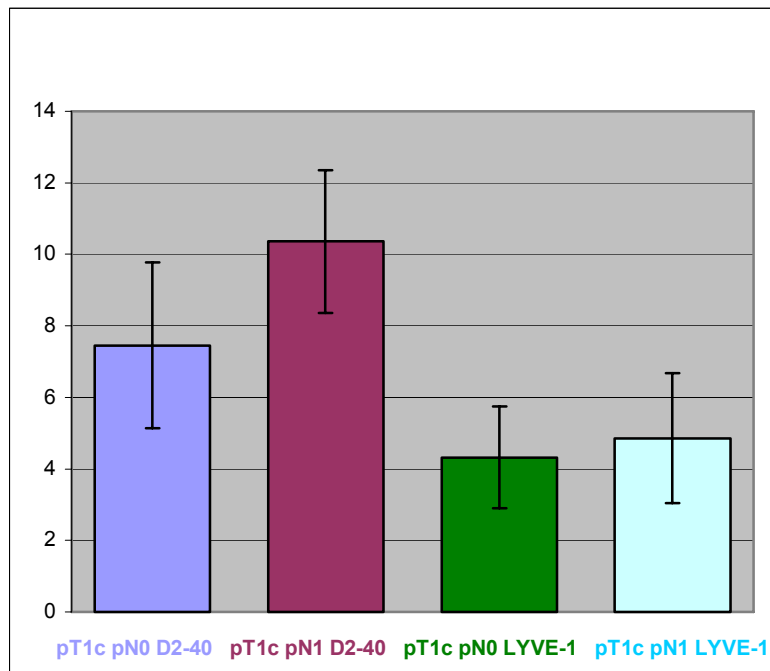


Diagramm 9 vergleichende graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* in pT1c-Tumoren bei pN0 und pN1-Situation für die Antikörper D2-40 und LYVE-1

Die Testung in den Untergruppen zeigte für den Antikörper D2-40 einen signifikanten Unterschied der Lymphgefäßanzahl in beiden Testverfahren (Antikörper D2-40: Wilcoxon-Scorewerte 0,0062; Median-Scorewerte 0,0061). Für den Antikörper LYVE-1 konnte beim statistischen Vergleich in beiden Testungen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Antikörper LYVE-1 Wilcoxon-Scorewerte 0,4835; Median-Scorewerte 0,9042) (Diagramm 9).

5.6.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung pT2 pN0 versus pT2 pN1

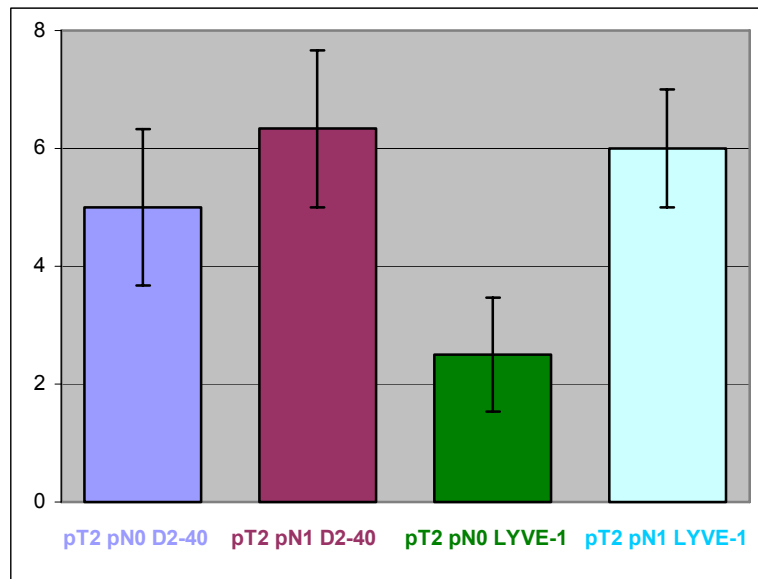


Diagramm 10 vergleichende graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* in pT2-Tumoren bei pN0 und pN1-Situation für die Antikörper D2-40 und LYVE-1

Im Ergebnis zeigte sich für den Antikörper D2-40 kein signifikanter Unterschied in beiden Testverfahren (Antikörper D2-40: Wilcoxon-Scorewerte 0,6343; Median-Scorewerte 0,8204). Für den Antikörper LYVE-1 ergab sich beim Wilcoxon-Test ein signifikanter Unterschied der Lymphgefäßdichte, der aber im Median-Test so nicht nachweisbar war (Antikörper LYVE-1 Wilcoxon-Scorewerte 0,0090; Median-Scorewerte 0,0519). Darstellung in Diagramm 10.

5.6.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus pT1-4 pN0/1

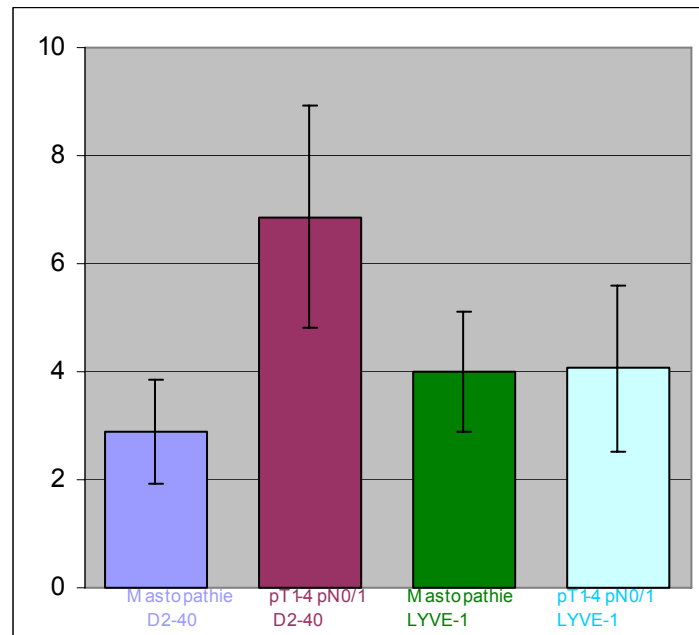


Diagramm 11 vergleichende graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* in nicht-neoplastisch verändertem Gewebe im Vergleich zu allen Karzinomen der Mamma für die Antikörper D2-40 und LYVE-1

Bei Vergleich der nichtneoplastisch veränderten Gewebeproben mit allen karzinomatös veränderten Gewebeproben zeigte sich für den Antikörper D2-40 ein eindeutig signifikanter Unterschied bei beiden Testverfahren (Antikörper D2-40: Wilcoxon-Scorewerte 0,0024; Median-Scorewerte 0,0096). Für den Antikörper LYVE-1 ließ sich kein Unterschied mit Signifikanz darstellen (Antikörper LYVE-1 Wilcoxon-Scorewerte 0,9312; Median-Scorewerte 0,6983). Zur Veranschaulichung dient das Diagramm 11.

5.6.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse der statistischen Bewertung Mastopathie versus pT1 pN0/1

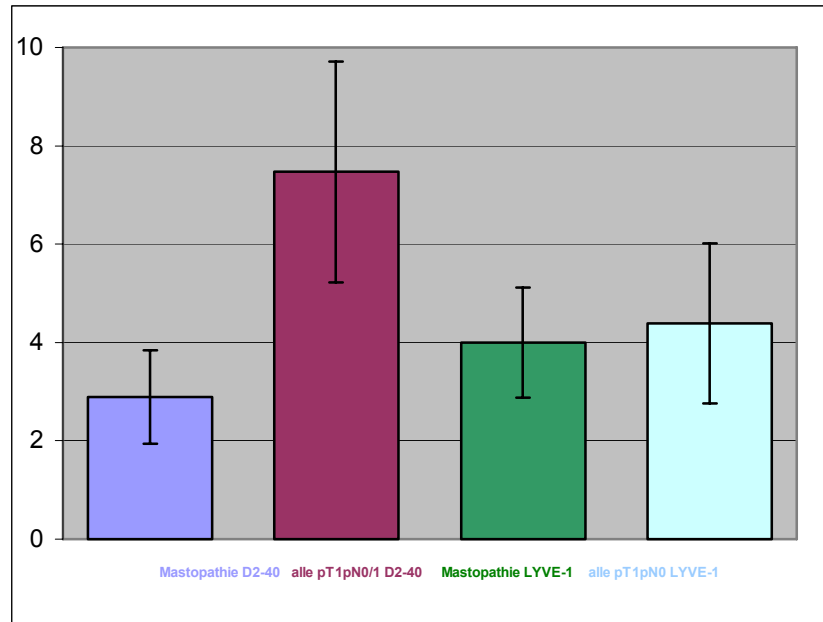


Diagramm 12 vergleichende graphische Darstellung der Lymphgefäßdichte im *lymphangiogenic hotspot* in nicht-neoplastisch verändertem Gewebe im Vergleich zu pT1-Karzinomen der Mamma für die Antikörper D2-40 und LYVE-1

Der Vergleich von nichtneoplastisch veränderten Gewebeproben mit karzinomatös veränderten Gewebeproben der pT1- Kategorie (mit und ohne nodale Metastasierung) zeigte auch hier für den Antikörper D2-40 einen eindeutig signifikanten Unterschied bei beiden Testverfahren (Antikörper D2-40: Wilcoxon-Scorewerte 0,0030; Median-Scorewerte 0,0088). Schon allein der Mittelwert der gezählten Lymphgefäße bei den T1-Tumoren war etwa doppelt so hoch, eine Überlappung der Standardabweichung war ebenfalls nicht nachweisbar (Diagramm 12). Für den Antikörper LYVE-1 ließ sich wiederum kein signifikanter Unterschied nachweisen (Antikörper LYVE-1 Wilcoxon-Scorewerte 0,9920; Median-Scorewerte 0,7206).

6. Diskussion

6.1 *Angiogenese - ein prognoserelevanter Parameter und ein neues Target für die onkologische Therapie*

Die Blutgefäßneubildung als Faktor zur Bestimmung der Progression solider Tumore wurde in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien untersucht. Die Angiogenesehemmung war und ist Ziel zahlreicher Untersuchungen und hat bereits zu praxisrelevanten Therapieansätzen geführt (Folkman 1972; Atiqur und Toi 2003; Fox et al. 2001; Ellis et al. 2001).

Die Bestimmung der Mikrogefäßdichte von Blutgefäßen als immunhistologisches Korrelat der tumorinduzierten Angiogenese stellt eine akzeptierte Methode zur Quantifizierung der Blutgefäßneubildung dar, wobei FVIII/vWF (von Willebrand Faktor) das am weitesten verbreitete Antigen zur Darstellung der Blutgefäße ist (Weidner 1995).

Mammakarzinome besitzen eine hohe Potenz zur Metastasierung in die regionalen Lymphabflussgebiete, daher muss das Lymphgefäßsystem als eine wichtige Struktur der Tumorzellverbreitung angesehen werden. Die nodale Metastasierung ist in der Regel neben der Tumorgroße als ein wichtiger prognostischer Faktor anzusehen.

Durch die Nutzung von spezifischen Lymphendothelzellmarkern, welche eine selektive Darstellung der Lymphgefäße im histologischen Routinematerial ermöglichen, sind lymphendotheliale Strukturen in den Fokus der aktuellen pathohistologischen Gefäßforschung gerückt (Franchi et al 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphgefäße an korrespondierenden Schnitten im Brustgewebe bewertet.

Eine tumorinduzierte Lymphangiogenese und deren eventuelle Bedeutung in der lymphogenen Metastasierung von Mammakarzinomen ist nicht abschließend geklärt. Ob die Quantifizierung der Lymphgefäßdichte mit den neuen immunhistochemischen Endothelzellmarkern D2-40 und LYVE-1 eine valide und vor allem in der täglichen Routinediagnostik taugliche Methode darstellt und ob über die Bestimmung der

Lymphgefäßdichte eine Aussage zur nodalen Metastasierung getroffen werden kann, wird mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse, im Kontext des aktuellen Wissensstandes, diskutiert.

6.2 D2-40 - Der geeignete Antikörper zur immunhistochemischen Markierung von Lymphgefäßen im Mammaparenchym

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Eignung der Antikörper D2-40 und LYVE-1 zur Detektion von Lymphgefäßen durch selektive Bindung von Oberflächenantigenen im Brustgewebe nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Lymphgefäßdichte nach immunhistochemischer Markierung im Karzinomgewebe sind in der Literatur neben Untersuchungen des Brustdrüsengewebes auch Ergebnisse bei anderen Tumorentitäten, so zum Beispiel für das Ovarial- und Cervixkarzinom, aber auch für Pharynx- und Colontumoren, verfügbar (Beasley 2002, Birner et al. 2000, Birner et al. 2001, Erovic et al. 2003; Fogt et al. 2004, Sauer und Deissler 2003).

In Übereinstimmung mit der Interpretation der eigenen Ergebnisse sehen auch andere Autoren die Option der Bestimmung der Lymphgefäßdichte mittels immunhistochemischer Markierung als einen hoffnungsvollen neuen Prognoseparameter (Gajados et al. 1999, Weber et al. 2000, Choi et al. 2005). Hierbei muss jedoch gewürdigt werden, dass die Marker unterschiedliche Reaktionsmuster aufweisen. So ist, nach Wertung der eigenen Ergebnisse, der Antikörper D2-40, trotz ausgeprägter Kreuzreaktivität, im Mammaparenchym zur Darstellung der Lymphgefäße besser als der Antikörper LYVE-1 geeignet. Dieses wurde auch in anderen Arbeiten so nachvollzogen (Choi et al. 2005, Kahn et al. 2002, Kaiserling 2004). Hingegen erzielte Akishima in seiner Arbeitsgruppe mit dem Antikörper LYVE-1 am Brustdrüsengewebe gute Ergebnisse (Akishima et al. 2004).

6.2.1 Einschränkungen der Lymphgefäßdichtebestimmung und Immunmarkierung der Lymphendothelzellen bei Applikation der Antikörper D2-40 und Antikörper LYVE-1

Trotz des Wertes der immunhistochemischen Markierung von Lymphendothelien gibt es objektive Faktoren, die zu Einschränkungen der potentiellen Nutzungsmöglichkeiten des Verfahrens führen, hierzu zählen Kreuzreaktionen der Antikörper mit nichtlymphoendothelialen Strukturen. Sie sind ein bekanntes Phänomen in der diagnostischen Immunhistochemie. Die Kenntnis und die adäquate Interpretation dieser Kreuzreaktionen sind die Voraussetzung für eine wegweisende Deutung immunhistochemischer Befunde in der diagnostischen Histopathologie. Deshalb ist es zwingend notwendig, diese Kreuzreaktivitäten zu bewerten und zu interpretieren, um den Standard der lymphatischen Mikrogefäßdichte beurteilen zu können. Zu den beobachteten Kreuzreaktionen zählt beim Antikörper D2-40 die Mitanfärbung der Myofibroblasten im Stroma der Mammakarzinome, diese treten im Mammaparenchym regelmäßig auf (Kaiserling 2004). Weiterhin kommt es zur Mitreaktion von Fibroblasten, Epithelzellen und Tumorzellen. Dieses Phänomen wurde ebenfalls durch Kaiserling beschrieben (Kaiserling 2004). Die intensive Anfärbung der Myofibroblasten stellt eine echte Schwierigkeit in der Bewertung der Immunreaktionen dar.

Beim Antikörper LYVE-1 konnten diese Kreuzreaktivitäten kaum beobachtet werden. Ein weiteres Problem stellt die nicht sichere Markierung von lymphendothelialen Strukturen dar. Insbesondere beim Antikörper LYVE-1 war dieses Phänomen auffällig. Im Vergleich von D2-40 und LYVE-1 scheint letzterer nur eine Subpopulation von Lymphendothelien zu markieren (Renyi-Vamos et al. 2005). Diese findet sich offenbar vornehmlich in der Tumorperipherie und damit in der Tumordinvasionszone.

Die unterschiedlichen Anfärbungen der Lymphendothelien sind neben methodischer Variabilität auch durch die Heterogenität der Populationen erklärbar. So wurde durch die Arbeitsgruppe um Garrafa beschrieben, dass Lymphendothelzellen abhängig von ihrer Lokalisation in den Organen und Lymphsegmenten eine unterschiedliche Struktur und daraus zu schließende Funktionalität haben (Garrafa et al. 2005).

In der Konsequenz erscheint daher eine automatische Bildanalyse (z. B. Computeranalyse), wie sie bei der *micro vessel density*-Bestimmung von Blutgefäßen möglich und üblich ist, zumindest für den Antikörper D2-40 nicht durchführbar (Weyn et al. 2004). Eine Markierung nichtrelevanter Strukturen muss durch die Bewertung eines erfahrenen Untersuchers aufgedeckt werden, da eine maschinelle Differenzierung zwischen den einzelnen angefärbten Objekten momentan nicht denkbar ist.

Eine Bildanalysestudie für lymphendotheliale Strukturen ist in der Literatur, in Einklang mit den eigenen Ergebnissen und dargestellten Schlussfolgerungen, bisher nicht beschrieben.

6.3 Der Vergleich der Antikörper D2-40 und LYVE-1 zur Lymphgefäßdichtebestimmung

In den eigenen Untersuchungen war der Antikörper D2-40 effektiver in der Markierung von lymphatischen Strukturen. Die Anzahl der markierten Lymphgefäße ist bei dem Antikörper LYVE-1 um bis zu 50 % im Vergleich zu dem Antikörper D2-40 vermindert. Problematisch sind jedoch die ausgeprägten Kreuzreaktionen des Antikörpers D2-40. Hingegen markiert der Antikörper LYVE-1 zuverlässig lymphoendotheliale Strukturen. Hier findet sich dagegen eine nicht vernachlässigbar große Rate an nicht markierten Lymphendothelien. In verschiedenen Arbeitsgruppen wird jedoch der Antikörper LYVE-1 zur Darstellung von Lymphgefäßen bevorzugt. Dem Antikörper LYVE-1 ist eine hohe Spezifität zu attestieren (Kato et. al 2005, Bono et al. 2005). Die Sensitivität erreicht nach eigener Einschätzung jedoch nicht das Maß des monoklonalen Antikörpers D2-40.

Die eigenen Resultate stehen in Konsens mit der bekannten Literatur. Auch dort wird festgestellt, dass sich der Antikörper D2-40 offensichtlich effektiver an die zu markierenden Strukturen bindet als der Antikörper LYVE-1 (Renyi-Vamos et al. 2005). Das durch D2-40 zwei unterschiedliche Oberflächenmoleküle angefärbt

werden, stellt eine denkbare Erklärung für das weitreichende Expressionsmuster dar. Neugebildete Lymphgefäße scheinen die durch D2-40 detektierten Oberflächenantigene früher zu exprimieren als für LYVE-1, womit die vermehrte Anfärbung durch D2-40 ebenfalls erklärt werden kann (Renyi-Vamos et al. 2005). Es kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, dass Oberflächenantigene auch durch Karzinomzellen oder deren Sekretionsprodukte verändert oder vernichtet werden. Dieser Prozess kann die Antikörperbindung erschweren oder gar unmöglich machen. Das stellt eine denkbare Erklärung für die verminderte Markierung von Lymphgefäßen mittels LYVE-1 dar.

Nach der eigenen vergleichenden Analyse erscheint der Antikörper D2-40 für Mammagewebe besser geeignet zu sein als der Antikörper LYVE-1.

Für die Problematik überaus wichtig sind die lymphangischen *hot-spots*. Die lymphangiogene Potenz eines Tumors ist nur in diesem Bereich deutlich, da Invasion und Proliferation in Tumoren als herdförmige Prozesse anzusehen sind. In Analogie zu den Beobachtungen von Weidner für die Prozesse der Angiogenese (Weidner et al. 1991; Weidner et al. 1992) gilt diese Aussage auch für Mammatumoren.

Eine generelle Empfehlung für die Bestimmung der Lymphgefäßdichte kann aber auf Grund von diskrepanten Kreuzreaktionen für verschiedene Tumorentitäten nicht gegeben werden. Schlussfolgernd wird hervorgehoben, dass beide hier untersuchten Antikörper Lymphgefäße in adäquater Weise markieren. Im täglichen Einsatz bleiben jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch Wünsche für Verbesserungen bezüglich der Spezifität und Sensivität offen (Hall et al. 2003).

In Übereinstimmung mit der recherchierten Literatur kann bisher noch kein Goldstandard für den histologischen Nachweis von Lymphgefäßen definiert werden. Durch verschiedene Autoren wird zum jetzigen Zeitpunkt die immunhistochemische Doppelmarkierung als Methode der Wahl angesehen (Evangelou et al. 2005).

6.4 Invasive Karzinome der Mamma sind durch eine hohe Lymphgefäßdichte gekennzeichnet

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis der Induktion der Lymphangiogenese durch invasive Karzinome der Mamma erbracht werden.

Nicht in allen Fällen von invasiven Karzinomen war ein lymphangiogener *hot-spot* nachweisbar. Im Falle des Nachweises von lymphgefäßdichten Bezirken im Karzinom war keine gleichmäßige Verteilung im Tumor sichtbar. In der Mehrzahl der Fälle befand sich dieser Bezirk in der Tumorperipherie. Dieser Bereich muss als Invasionsfront des Karzinoms angesprochen werden. Im Unterschied dazu findet sich bei Blutgefäßen eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Tumor (Weidner et al. 1991). Das Auftreten eines lymphgefäßdichten Bezirkes ist somit als ein besonderes Phänomen im Tumor anzusehen. Da offensichtlich deutliche Unterschiede zwischen der Angiogenese und der Lymphangiogenese bestehen, war die Adaptation des Auswertungsverfahrens nach Weidner mit Einbeziehung nur eines Gesichtsfeldes notwendig und folgerichtig. Die Bildung der Vergleichsgruppen zur statistischen Prüfung erfolgte vor dem Hintergrund eines onkologisch korrekten Vorgehens. Durch die Gegenüberstellung von gleichen Tumorkategorien konnten die Beeinflussung durch andere tumorbiologische Faktoren, insbesondere die Tumorgröße, ausgeschlossen werden. Eine Zusammenfassung aller Tumorstadien mit dem Vergleich von nodal-negativen und nodal-positiven Fällen wurde als, auch aus onkologischer Sicht, nicht sinnvoller Ansatz gesehen und deshalb nicht durchgeführt.

Insbesondere mit Hilfe des Antikörper D2-40 war ein statistisch signifikanter Anstieg der Lymphgefäßzahl in Mammakarzinomen nachweisbar. Der Mittelwert beim Antikörper D2-40 lag bei nicht-neoplastisch verändertem Brustdrüsengewebe bei 2,89; für den Antikörper LYVE-1 beträgt der Wert in diesem Gewebe 4,00. In allen erfassten Mammakarzinomen liegen die Mittelwerte für den Antikörper D2-40 bei 6,87 und für den Antikörper LYVE-1 bei 4,07.

In den bisher veröffentlichten Studien wurde dieser Aspekt für das Mammakarzinom ebenfalls bestätigt. Weitergehend wird beim Nachweis einer erhöhten Lymphgefäßdichte von verschiedenen Autoren eine deutliche Verschlechterung der Prognose der Brustkrebserkrankung beschrieben (Kato et al. 2005, Bono et al. 2005). Die bei anderen Tumorentitäten, hier seien beispielhaft das Pharynx- und das Colonkarzinom erwähnt, durchgeführten Untersuchungen zum Anstieg der Lymphgefäßdichte bestätigten diese These ebenfalls (Franchi et al. 2004; Fogt 2004). Hingegen wird das Vorhandensein der Lymphangiogenese aber auch durch einige Autoren bestritten, hier sind unter anderem Agarwal und Williams zu erwähnen (Agarwal et al 2005; Williams et al. 2003, Clarijs et al. 2001).

Der Nachweis des statistisch signifikanten Anstiegs der Anzahl der Lymphgefäße im Mammakarzinom des Menschen ist somit im Einklang mit den Bewertungen durch verschiedene Autoren, aber auch nicht unumstritten.

Die These kann aber durch tierexperimentelle Untersuchungen gestützt werden. Hierbei wurde der Nachweis von wachstumsfördernden Faktoren im Karzinom, wie VEGF-C und VEGF-D und deren Rezeptor VEGFR-3 erbracht (Mandriota et al. 2001, Stacker et al. 2001, Karpanen et al. 2001).

Damit kann auch das von einigen Autoren beschriebene Argument, bei der erhöhten Anzahl von Lymphgefäßen im *lymphangiogenic-hotspot* handelt es sich lediglich um die komprimierten, bereits vorbestehenden Lymphgefäße (z.B. Leu et al. 2000), entkräftet werden.

Das Spektrum der Wachstumsfaktoren und die daraus folgende gesteigerte Mikrogefäßdichte ist also nicht überraschend und vielmehr zellbiologisch folgerichtig. Aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchung ist hierzu keine Stellungnahme und Untermuerung möglich. Eine dezidierte Untersuchung des Faktes erfolgte nicht. In der Auswertung fiel jedoch auf, dass der *hot-spot* eher in peripheren Anteilen der Karzinome nachgewiesen wurde. Diese kann auch als Invasionszone des Tumors beschrieben werden. In diesem Bereich findet die Neubildung und Rekrutierung des Stromas, inklusive der Blut- und Lymphgefäße, statt.

6.5 Unterschiede zwischen Hämangiogenese und Lymphangioneogenese im invasiven Mammakarzinom

Entsprechend der Theorie von Folkman ist es essentiell, dass Tumoren über 2 mm Größe eine eigene Blutgefäßversorgung haben und somit ist ein Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und Hämangioneogenese zwingend.

Für Lymphgefäße ist ein solcher Zusammenhang zunächst noch nicht erkennbar.

In der kolischen Mukosa sind z. B. keine Lymphgefäße enthalten, weshalb ein infiltratives Wachstum maligner epithelialer Zellen innerhalb der kolischen Mukosa nicht zu einer lymphatischen Metastasierung führt. Auch ist bisher ein Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und einer Lymphangioneogenese als

zwingende Voraussetzung für die Entwicklung eines größeren soliden Tumors nicht etabliert (Sundlisaeter et al. 2007).

In der eigenen Untersuchung konnte der Nachweis einer Lymphangioneogenese im ductalen Carcinoma in situ (DCIS) der Brust nicht erbracht werden. Hingegen ist die Haemangioneogenese in dieser Entität allgemein anerkannt und durch Studien belegt (Vogl et al. 2005).

Ein Charakteristikum von Karzinomen ist die Neigung zur lymphatischen Metastasierung, für die als Voraussetzung das Eindringen von Tumorzellen in Lymphgefäße gebraucht wird.

Ohne Lymphangioinvasion kann somit keine lymphatische Metastasierung erfolgen. Diese wiederum erfordert peritumorale oder intratumorale Lymphgefäße.

Folglich besteht ein klarer konzeptioneller Zusammenhang zwischen vorbestehenden Lymphgefäßen, Lymphangioneogenese und dem Auftreten einer nodalen Metastasierung.

Aus der vorliegenden Studie lässt sich somit für das Mammakarzinom schlussfolgern, dass eine Induktion der Lymphangioneogenese zeitlich gesehen erst deutlich nach der Haemangioneogenese erfolgt.

In der ausgewerteten klinischen Literatur ist diese Schlussfolgerung, das Mammakarzinom betreffend, bisher von noch keinem Autor gezogen worden.

6.6 Die lymphatische Mikrogefässdichte - ein Indikator für die nodale Metastasierung

Peritumorale oder intratumorale Lymphgefäße stellen, wie bereits postuliert, eine Grundvoraussetzung der lymphonodalen Metastasierung dar. Statistisch gesehen erhöht die gesteigerte Zahl von Lymphgefäßen das Risiko der Invasion von Tumorzellen in die Lymphgefäße und damit wiederum die Gefahr der Metastasierung.

Diese These kann in der vorliegenden Studie, insbesondere anhand der statistischen Bewertung der vorliegenden Daten für den Antikörper D2-40 eindeutig unterstützt werden.

Die lymphatische Mikrogefässdichte ist zudem unabhängig von anderen etablierten Prognosefaktoren wie etwa Tumorgröße und Grading. Es bestehen hier keine nachweisbaren Korrelationen.

In der vorliegenden Literatur konnte auch kein Hinweis auf eine Korrelation zum Grading der Mammakarzinome bezüglich der Hämangiogenese gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass hier offensichtlich gleichartige zellbiologische Wirkprinzipien bestehen.

6.7 Die lymphatische Mikrogefässdichte in Fibroadenomen

Fibroadenome sind im histologischen Bild als zusammengesetzte Tumoren aus einer epithelialen und einer mesenchymalen Komponente zu sehen. Die Hauptmasse des Tumors besteht aus fibroblastärem Gewebe. Der epitheliale Anteil ist nur gering ausgeprägt. Vergleichbar sind hier Sarkome. Diese sind von der histologischen Grundstruktur mesenchymale Tumore. Der Metastasierungsweg bei solchen Tumoren ist vor allem ein haematogener, selten lymphogener Prozess (Padera et al. 2002). Dies lässt den Schluss zu, dass mesenchymale Strukturen weniger als Epithel zur Lymphangiogenese fähig sind. Bei der Bestimmung der Lymphgefässdichte der in die Studie einbezogenen Fibroadenome war auffällig, dass im eigentlichen Fibroadenom keine lymphoendothelialen Strukturen zur Anfärbung kamen. Im korrespondierenden H&E-Präparat konnten ebenfalls keine lymphatischen Strukturen identifiziert werden. Offensichtlich sind auf Grund des langsamen Wachstums im Fibroadenom die Spiegel von Wachstumsfaktoren nicht ausreichend, um ein eigenständiges Lymphgefäßnetz zu rekrutieren. Dies impliziert das Fehlen oder zumindest die hochgradige Reduzierung der Lymphgefäßdichte in Fibroadenomen.

6.8 Die Bedeutung von fehlenden Lymphgefäßen für Karzinome in Fibroadenomen der Mamma

In Fibroadenomen der Mamma treten selten Karzinome auf. Ein Fall aus der vorliegenden Untersuchung, mit dem Nachweis eines auf ein Fibroadenom beschränkten invasiv-duktales Karzinoms, wurde analysiert. Der Fakt der fehlenden Lymphgefäße scheint bei einer Sonderform des Mammakarzinoms von nicht unerheblicher Bedeutung zu sein. Bei dem in die Studie einbezogenen auf ein Fibroadenom beschränkten Karzinoms der Mamma ließen sich sowohl mit dem Antikörper D2-40 als auch mit dem Antikörper LYVE-1 keine Lymphgefäße darstellen. Bei der Überprüfung an korrespondierenden H&E-Schnitten war ebenfalls kein Hinweis auf lymphatische Strukturen zu finden. Dies impliziert wiederum auch das Fehlen oder zumindest die hochgradige Reduzierung der Lymphgefäßsdichte bei Karzinomen die auf ein Fibroadenom beschränkt sind. Auch in den Fibroadenomen der Mamma aus der eigenen Fallserie konnten keine Lymphgefäße nachgewiesen werden. Folglich besitzt ein auf ein Fibroadenom beschränktes Karzinom nicht die Kompetenz zur Lymphgefäßinduktion. Vergleichbar erscheint die Situation bei Karzinomen im phleomorphen Adenom der Parotis (Kunimura 2007). Auch hier kommt es auf Grund fehlender Lymphgefäße bei auf das Adenom beschränkten Karzinomen nicht zu einer lymphogenen Metastasierung. Ähnlich gelagert sind intramukosale Karzinome im Kolon und auch Karzinome, welche auf ein Kolonadenom beschränkt sind. Diese sind laut aktueller WHO-Klassifikation als intramukale Neoplasien eingestuft (Wittekind et al. 2002). Eine Einstufung als Karzinom erfolgte nicht, weil es zu keiner Metastasierung kommt. Allgemein anerkannt ist der Fakt, dass bei solchen Befunden auf eine Lymphadenektomie der regionalen Abflussgebiete verzichtet werden kann. In Analogie zu diesem bereits etablierten Vorgehen und den postulierten Hypothesen kann bei der Sonderform des auf ein Fibroadenom beschränkten Mammakarzinoms auf eine Ausräumung der regionären Lymphknoten verzichtet werden.

Diese Aussage trifft sowohl für das aktuelle Sentinel-Lymphknoten-Konzept als auch für die eigentliche axilläre Lymphonodektomie zu.

Anhand der bei der Studie erhobenen zellbiologischen Daten erscheint es möglich, diese neue und konzeptionell wichtige Beobachtung in die operative Therapie

einzubringen. Sicher ist nur ein kleiner Teil von Patienten betroffen. Aber hier ist eine klare und eindeutige Reduktion des therapeutischen Vorgehens möglich, welche sicher zur Reduktion der operationsbedingten Morbidität führt.

Das Ziel, eine individuell angepasste Tumorthherapie zu erreichen, findet sich auch in der aktuellen S3-Leitlinien zur Therapie der Mammakarzinome wieder (Kreinenberg et al. 2004). Dort wird im Falle der tubulären Karzinome der Mamma die Lymphonodektomie nicht mehr gefordert. Tubuläre Mammakarzinome besitzen apriori insgesamt nur ein sehr niedriges Malignitätspotential.

6.9 Die Erhöhung der lymphatischen Mikrogefäßsdichte - ein potentieller Indikator der nodalen Metastasierung

Einige Studien verdeutlichen bereits, dass die Lymphangiogenese eine wichtige Rolle bei der Metastasierung solider Tumore spielt, aber die Bedeutung im Fall des Mammakarzinoms ist zunächst noch nicht eindeutig geklärt. Nach ausführlichem Literaturstudium existieren nur wenige Untersuchungen zur Lymphgefäßsdichte und Lymphangiogenese beim Mammakarzinom, obwohl gerade diese Karzinome durch eine hohe Inzidenz auffallen und daher eine Untersuchung nahe liegt.

Bislang vorliegende Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse und erlauben keine generelle Aussage über die Rolle der Lymphgefäßsdichte im Hinblick auf die synchrone nodale Metastasierung.

In der eigenen Arbeit zeigte sich für den Antikörper D2-40 die Lymphgefäßsdichte in T1-Karzinomen mit nodaler Metastasierung gegenüber Karzinomen ohne nodale Metastasierung signifikant erhöht ($p=0,0062$ (Wilcoxon-Score); $p=0,0061$ (Median-Score)). Ebenso gelang der Nachweis der Steigerung der Lymphgefäßszahl bei invasiven Tumoren im Vergleich zu nichtneoplastischen Mammaläsionen. Für den Antikörper D2-40 konnte der Zusammenhang zwischen der Lymphgefäßsdichte und der nodalen Metastasierung als signifikant gesichert werden ($p=0,0024$ (Wilcoxon-Score); $p=0,0096$ (Median-Score)). Die Grundlage für die Lymphangiogenese stellt

das vorbestehende Lymphgefäßsystem dar, daher könnte das Ursprungsgewebe für das Ausmaß der Lymphgefäßneubildung von Bedeutung sein. In Bezug auf die Studien zur Lymphgefäßdichte von Mammakarzinomen muss angenommen werden, dass die heterogenen Untersuchungsergebnisse, neben der tatsächlich bestehenden biologischen Variabilität, durch Abweichungen in der Methodik zustande gekommen sind. Die vorliegende Studie belegt das Vorhandensein einer erhöhten Lymphgefäßdichte im Mammakarzinom. Auch in der Mehrzahl der publizierten Untersuchungen wird dieser direkte Zusammenhang gesehen (z. B. Bjorndahl et al. 2005, Bono et al. 2004, Skobe et al. 2001). In einigen Arbeiten wurde die Beziehung zwischen der erhöhten Lymphgefäßdichte und nodaler Metastasierung so nicht nachvollzogen. (z. B. Williams et al. 2003). Hier kann, trotz konzeptioneller Unterschiede, auf die Angiogenese verwiesen werden. Dort konnte eine signifikante Korrelation zum Gesamtüberleben der Patienten nur bei Bewertung der vaskulären *hot-spots* nachgewiesen werden (Choi et al. 2005)

Der Lymphknotenstatus ist momentan noch ein wesentliches Kriterium für die Prognose und das sich anschließende Therapieregime dieser Karzinome (Christodoulakis et al. 2003; Thomssen et al. 2003). Die Bewertung der peritumoralen Lymphgefäßdichte am primären Operationspräparat stellt, neben dem aktuellen Staging eine neue Methode zur Erweiterung der prognostischen Aussagekraft des histologischen Präparates dar. Ziel sollte es sein, mittels der Lymphgefäßdichte als Indikator für nodale Metastasierung Risikopatienten zu identifizieren. Dies könnte eine Entscheidungshilfe bei differenter Dissektion der axillären Lymphknoten, auch des Sentinel-Lymphknotens sein.

Es konnte gezeigt werden, dass die Lymphgefäßdichte ein aussagekräftiger Indikator der synchronen nodalen Metastasierung im Mammakarzinom ist. Eine Klärung der individuellen Situation ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings, gerade wegen des Fehlens von evaluierten Methoden der Detektion von Lymphgefäßen, nicht möglich.

6.10 Anti-Lymphangiogenese - eine mögliche Option der Therapie solider Tumore

Lymphgefäße sind als mögliche Zielstruktur neuer Therapiekonzepte in das wissenschaftliche Interesse gerückt.

Da verschiedene Typen von Karzinomen mit hoher Frequenz zu den regionalen Lymphknoten metastasieren und der Lymphknotenstatus wichtig für das Überleben der Patienten, auch im Kontext weiterer tumorbiologischer Faktoren ist, scheint der Angriff an diesem Punkt der Kaskade sinnvoll. Aktuell ist durch die weitgehende Nutzung der Sentinel-Lymphknotenbiopsie beim Mammakarzinom eine Deeskalierung der chirurgischen Radikalität und damit der postoperativen Morbidität erreicht. Wegen der Häufigkeit der Mammakarzinome scheint jedoch eine weitere Eingrenzung des Hochrisikopatientengutes auch aus gesundheitsökonomischen Gründen sinnvoll.

Die VEGFs sind die am weitesten erforschten Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese. Analog der anti-angiogenen Therapie, könnten sie die primären Angriffspunkte der zukünftigen anti-lymphangiogenen Therapie darstellen.

Möglich sind sicher unterschiedliche Formen von Antikörpern oder Rezeptorblockern, welche die Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D und deren Rezeptor VEGFR-3 irreversibel blockieren. He und Mitarbeiter zeigten, dass die tumorassoziierte Lymphangiogenese experimentell mit einem löslichen VEGFR-3 Fusionsprotein geblockt und die lymphogene Metastasierung unterdrückt werden konnte (He et al. 2002).

Tyrosinkinaseinhibitoren stellen eine weitere Option zur Hemmung der Rezeptorfunktion dar (Stacker et al. 2006).

Die stetig steigende Zahl von neuentdeckten Molekülen mit Einfluss auf die Lymphangiogenese, scheint immer mehr Möglichkeiten zur Beeinflussung dieses Prozesses zu bieten (Ross et al. 2003). Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob die Hemmung der Lymphangiogenese als Monotherapie wirksam sein kann. Bewiesen ist, dass einige Substanzen der Angiogenese wie zum Beispiel VEGF-A auch die Lymphangiogenese induzieren. Bjorndahl und Mitarbeiter wiesen nach, dass die

Insulin-like growth factors 1 und 2 in vivo proliferationssteigernd auf Lymphendothelzellen wirken (Bjorndahl et al. 2005).

Cao und Mitarbeiter zeigten, dass PDGF (*platelet-derived growth factor*) ein potenter Induktor der Lymphangiogenese ist (Cao et al 2006). Transkriptionsfaktoren wie Prox-1, Oberflächenmoleküle wie Podoplanin, LYVE-1 und D2-40, aber auch Proteasen als Aktivatoren von VEGF-C und -D, wie Plasmin, zeigen weitere Wege der Anti-Lymphangiogenese, unabhängig von den Wachstumsfaktoren, auf.

Analog der Anti-Angiogenese stellen die tumorassoziierten Lymphgefäße das Angriffsziel der vaskulären Therapie dar. LyP-1 ist ein Peptid das die Apoptose von Lymphgefäßen selektiv im Tumor realisiert (Laakkonen et al. 2004).

Der Einsatz der Anti-Lymphangiogenese ist sowohl neoadjuvant, als auch adjuvant vorstellbar (Stacker et al. 2006).

Momentan ist die Anti-Lymphangiogenese klinisch noch nicht relevant. Um die Prognose von Karzinomen, welche die Lymphangiogenese induzieren, zu verbessern, erscheint eine Hemmung der lymphogenen Metastasierung als eine mögliche und hoffnungsvolle Option.

7. Schlussfolgerungen

In den eigenen Untersuchungen war der Antikörper D2-40 effektiver in der Markierung von lymphatischen Strukturen. Die Anzahl der markierten Lymphgefäße ist bei dem Antikörper LYVE-1 deutlich im Vergleich zu dem Antikörper D2-40 vermindert. Problematisch sind jedoch die ausgeprägten Kreuzreaktionen des Antikörpers D2-40. Hingegen markiert der Antikörper LYVE-1 zuverlässig lymphoendotheliale Strukturen. Daraus ergibt sich, dass eine generelle Empfehlung für die Bestimmung der Lymphgefäßdichte, aber auf Grund von diskrepanten Kreuzreaktionen für verschiedene Tumorentitäten, und hier insbesondere für das Mammakarzinom, nicht gegeben werden kann. Schlussfolgernd wird hervorgehoben, dass beide hier untersuchten Antikörper Lymphgefäße in adäquater Weise markieren. Im täglichen Einsatz bleiben jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch Wünsche für Verbesserungen bezüglich der Spezifität und Sensivität offen.

Die Induktion einer Lymphangiogenese ist eine typische Eigenschaft von invasiven Karzinomen der Mamma. Nodal metastasierte Mammakarzinome, vor allem der Kategorie pT1 und pT2, haben eine signifikant erhöhte lymphatische Mikrogefäßsdichte.

Die lymphatische Mikrogefäßsdichte ist folglich ein potentieller prediktiver Marker für das Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen. Damit ist potentiell die Möglichkeit zur differenzierten Indikationsstellung der axillären Lymphonodektomie, auch in Hinblick auf den Einsatz der Sentinel-Node-Biopsie, möglich.

Die Lymphangiogenese ist ein Teil der tumorassoziierten Stromainduktion und damit ein Teil der Kaskade der Tumorprogression.

Da aber offensichtlich konzeptionelle Unterschiede zwischen der Hämangio- und der Lymphangiogenese bestehen, ist eine Fortsetzung der Untersuchungen zur Lymphangiogenese nützlich und sinnvoll.

Eine Untersuchung zur Korrelation von lymphatischer Mikrogefäßsdichte und dem Gesamtüberleben ist notwendig. Damit wird dann die Möglichkeit gegeben darzustellen, welchen Teil der Stromainduktion und Tumorprogression die lymphatische Mikrogefäßsdichte beschreibt.

1. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehotra S, Badve S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 2005 Nov;29 (11):1449-1455
2. Ahlgren M, Melbye M, Wohlfahrt J, Sorensen TI. Growth patterns and risk of breast cancer in women. *N Engl J Med*. 2004 Oct 14;351(16):1679-1681
3. Akishima Y, Ito K, Zhang L, Ishikawa Y, Orikasa H, Kiguchi H, Akasaka Y, Komiyama K, Ishii T. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch*. 2004 Feb; 444(2): 153-157
4. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1994;16:35-42
5. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. Apr 2002; 1(3):219-227
6. Alitalo K. Growth factors controlling angiogenesis and lymphangiogenesis *Ugeskrift for laeger*:2002 Jun 10;164(24):3170-3172
8. American Society of Clinical Oncology. 1997 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on November 7, 1997 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1998; 16:793-795(NHMRC)
9. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (ed) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland – Häufigkeit und Trends. 3. erweiterte, aktualisierte Auflage; 2002
10. Arnaud S, Houvenaeghel G, Moutardier V, Butarelli M, Martino M, Tallet A, Braud AC, Jaquemier J, Julian-Reynier C, Brenot-Rossi I. Patients' and surgeons' perspectives on axillary surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004 Sep ;30(7) :735-743

11. Atiqur Rahman M, Toi M. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2003 Dec;57(10):463-70.
12. Bamberger, ES; Perrett, CW. Angiogenesis in epithelial ovarian cancer *Molecular Pathology.* 55(6): 348-359, December 2002
13. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2002 Mar 1;62(5):1315-1320
14. Bembenek A, Schlag PM. Lymph-node dissection in breast cancer *Langenbeck's Arch Surg*(2000)385:236-245
15. Berg JW, Robbins GF. Factors influencing short and long term survival of breast cancer patients. *Surgery, gynecology and obstetrics* 1966 Jun;122(6):1311-1316
16. Bilir A, Eralp Y, Cabioglu N, Agizhali B, Camlica H, Aydinler A. Thymidin labeling index: prognostic role in breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2004 Aug;27(4):400-406
17. Birner P, Obermair A, Schindl M, Kowalski H, Breitenecker G, Oberhuber G. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Jan;7(1):93-97
18. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor early-stage invasive cervical cancer. *Int J Cancer.* 2001 Jan 20; 95(1): 29-33
19. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res.* 2000 Sept-Oct;20(5A):2981-2985.

20. Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB, Brakenhielm E, Religa P, Galter D, Wu L, Cao Y. 2005. Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 15;65(20):9261-8.
21. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, Zhou Z, Jackson D, Hansen AJ, Cao Y. 2005. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(43):15593-8.
22. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *British J Cancer* 1957 Sep;11(3):359-377
23. Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel number are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 1;10(21):7144-7149
24. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, Sassi F, Castellani P, Berndt A, Kosmehl H, Biro A, Siri A, Orecchia P, Grassi J, Neri D, Zardi L. Selective targeted delivery of TNF alpha to tumor blood vessels. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4384-4392.
25. Bourez RL, Rutgers EJ, Van De Velde CJ. Will we need lymph node dissection at all in the future? *Clin Breast Cancer.* 2002 Dec;5(5):315-322
26. Brenin DR, Morrow M, Moughan J, Owen JB, Wilson JF, Winchester DP. Management of axillary lymph nodes in breast cancer: a national patterns of care study of 17,151 patients. *Ann Surg.* 1999 Nov;230(5):686-691
27. Brice P. Array of hope. *Health Serv J.* 2004 Sept 16;114(5923):24-25
28. Buxant F, Anaf V, Simon P, Fayt I, Noel JC. Ki-67 immunostaining activity is higher in positive axillary lymph nodes than in the primary breast tumor. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Sep;75(1):1-3

29. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, Meister B, Ikomi F, Tritsarlis K, Dissing S, Ohhashi T, Jackson DG, Cao Y. 2006. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 6(4):333-45.
30. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size , lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63:181-187.
31. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and IG-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb; 4(2):118-32
32. Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr; 1014:58-66
33. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumor progression: is it all in a switch? *Cancer Lett*. 2002 Feb 25; 176(2):123-8
34. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis Ga, Cohen C, Young AN. Angiogenic and lymphangiogenic microvesseldensity in breast carcinoma:correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005 Jan; 18(1):143-152
35. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-616
37. Clarijs R, Ruiter DJ, de Waal RM. Lymphangiogenesis in malignant tumours : Does it occur ? *J Pathol*. 2001 Feb; 193 (2): 143-6
38. Clark GM. Prognostic and predictiv factors for breast cancer. *Breast Cancer*. 1995;2:79-89
39. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzotti G, Maisonneuve P, Viale G, Renne G, Casadio C, Veronesi P, Intra M, Torrisi R,Goldhirsch A. Minimal and small size

- invasive breast cancer with no axillary lymph node involvement: the need for tailored adjuvant therapies. *Ann Oncol.* 2004 Nov;15(11):1633-1639
40. Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1: 23-28
 41. Corandini D, Daidone MG. Biomolecular prognostic factors in breast cancer *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004 Feb;16(1):49-55
 42. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE. Lymphangiogenesis Quantification using quantitative PCR and breast cancer as a model *Biochemical and Biophysical Res. Comm.* Vol 288, Issue 4: 1043-1046, 9.Nov 2001
 43. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol. Histopathol.* 17(2002),863-870
 44. DacoCytomation. Users' Manual for ChemMate™ Detection Kit, Alkaline Phosphatase /RED, Rabbit/Mouse Code No. K 5005, 2nd edition, 2004
 45. Daidone MG, Paradiso A, Gion M, Harbeck N, Sweep F, Scmitt M. Biomolecular features of clinical relevance in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004 Jun;31 Suppl 1:3-14
 46. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lauvant MN, Allasia C, Bonnier P, Taranger-Charpin C. Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF- R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer(n=905). *B J Cancer.* 2004 Mar 22;90(6):1216-1221
 47. Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lauvant MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105 and CD31 immunocytochemical expression. *Hum Pathol.* 2004 Feb;35(2):176-183

48. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch.* 2007 Jul;451(1):19-25. Epub 2007 Jun 12.
49. Durand MK, Bodker JS, Christensen A, Dupont DM, Hansen M, Jensen JK, Kjølgaard S, Mathiasen L, Pedersen KE, Skeldal S, Wind T, Andreassen PA. Plasminogen activator inhibitor-I and tumor growth, invasion, and Metastasis. *Throm Haemost.* 2004 Mar;91(3): 438-449
50. Elledge RM, Clark GM, Chamness GC. Tumorbiologic factors and breast cancer prognosis among white, Hispanic and black women in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:705-712
51. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shaheen RM, Reinmuth N. Overview of angiogenesis: Biological implications for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol.* 2001 Oct;28(5 Suppl 16):94-104.
52. Ellston CW, Ellis IO. Pathological and prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19: 403-410.
53. Erovic BM, Neuchrist C, Kandutsch S, Woegerbauer M, Pammer J. CD9 expression on lymphatic vessels in head and neck mucosa. *Mod Pathol.* 2003 Oct;16(10):1028-34.
54. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(3) :109-118
55. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. 2005. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol.* 18(11):1490-7.

56. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. IARC Cancer BASE No. 5. IARC Press. 2001
57. Ferrara N, Alitalo K. 1999. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 5(12):1359-64.
58. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer.* 1983;52:1551-1557.
59. Fisher B, Wolmark N, Bauer M, Redmond C, Gebhardt M.
The accuracy of clinical nodal staging and of limited axillary dissection as a determinant of histologic nodal status in carcinoma of the breast
Surg Gynecol Obstet. 1981 Jun;152(6):765-772
60. Fogt F, Pascha TL, Zhang PJ, Gausas RE, Rahemtulla A, Zimmerman RL. Proliferation of D2-40-expressing intestinal lymphatic vessels in the lamina propria in inflammatory bowel disease. *Int J MOL Med.* 2004;13(2): 211-214
61. Fogt F, Zimmerman RL, Ross HM, Daly T, Gausas RE. Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol Rep.* 2004 Jan; 11(1): 47-50
62. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med.* 2003 Nov;3(7):643-51.
63. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol.*1985: 42-62.
64. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.*2002 Dec;29(5 Suppl 16):15-18.

65. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg.* 1966 ;164:491-502
66. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2001 May;2(5):278-89.
67. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101(5):973-978
68. Gajados C, Tartter PI, Bleiweiss IJ. Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancer. *Ann Surg.* 1999 Nov; 230(5):692
69. Garrafa E, Trainini L, Benetti A, Saba E, Fezzardi L, Lorusso B, Borghetti P, Bottio T, Ceri E, Portolani N, Bonardelli S, Giulini SM, Annibale G, Corradi A, Imberti L, Caruso A. Isolation, purification, and heterogeneity of human lymphatic endothelial cells from different tissues. *Lymphology.* 2005(4):159-66.
70. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez FA, Buelta L, Val-Bernal JF. Predictors of axillary lymph node metastases in patients with invasive breast carcinoma by a combination of classical and biological prognostic factors. *Pathol Res Pract.* 1999;195(9):611-618
71. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.* 1994;220:391-398
72. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Jul; 129(7): 716-9

73. Harbeck N, Kates RE, Gaugner K, Willems A, Kiechle M, Magolden V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Throm Haemost.* 2004 Mar;91(3): 450-456
74. Harbeck N, Kates R, Look MP. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to uPA and PAI I. *Br Cancer Res.* 2002;62: 4617-4622
75. Harbeck N, Kates R, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors uPA and PAI I for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol.* 2002;20:1000-1007
76. Harten Hans-Ulrich, Nägerl Hans, Schulte Hans Dieter. *Statistik für Mediziner* Chapman & Hall; Weinheim 1994
77. He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3737-3740
78. Hirakawa S, Hong Y-K, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M. Identification of Vascular Lineage- Specific Genes by Transcriptional Profiling of Isolated Blood Vascular and Lymphatic Endothelial Cells. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 575-586
79. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix-metalloproteinase-2 (MMP-2) in T(1-2)N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Jan;77(1):85-91
80. Hölzel D, Engel J, Schmidt M, Sauer HJ. Modell zur primären und sekundären Metastasierung beim Mammakarzinom und dessen klinische Bedeutung. *Strahlentherapie und Onkologie.* 2001 Jan; 177(1):10-24

81. Huang E , Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, West M, Nevins JR, Huang AT. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003 May 10;361(9369):1576-1577
82. Iwata H. Perspective of trastuzumab treatment. *Breast Cancer*. 2007; 14(2): 150-155
83. Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends in Immunology* 2001 Jun; 22(6): 317-321
84. Jacquemier J, Mathoulin-Portier MP, Valtola R, Charafe-Jauffret E, Geneix J, Houvenaeghel G, Puig B, Bardou VJ, Hassoun J, Viens P, Birnbaum D. Prognosis of breast-carcinoma lymphagenesis evaluated by immunohistochemical investigation of vascular-endothelial-growth-factor receptor 3. *Int J Cancer*. 2000 Jan 20;89(1):69-73
85. Jaeger, Tim M.; Weidner, Noel; Chew, Karen; Moore, Dan H.; Kerschmann, Russell L.; Waldman, Frederic M.; Carroll, Peter R. Tumor Angiogenesis Correlates with Lymph Node Metastases in Invasive Bladder Cancer. *Journal of Urology*. 154(1): 69-71, July 1995
86. Ji RC, Kato S. Lymphatic network and lymphangiogenesis in the gastric wall. *Histochem Cytochem*. 51(3): 331-8, Mar 2003
87. Ji RC, Qu P, Kato S. Application of a new 5'-Nasemononuclear antibody specific for lymphatic endothelial cells. *Lab Invest*. 2003;83:1681-1683
88. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol*. 2002 Apr; 15(4): 434-40

89. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest.* 82(9): 1255-1257, September 2002
90. Kaiserling E. Immunhistochemische Darstellung von Lymphgefäßen mit D2-40 in der diagnostischen Pathologie. *Pathologe* 2004; 25: 362-374
91. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K. 2001. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 1;61(5):1786-90.
92. Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Feb;13(1):9-18
93. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol.* 2002 Jan;4(1):E2-5
94. Kato T; prevo R, Steers G, Roberts H, Leek Rd, Kimura T, Kameoka S, Nishikawa T; Kobayashi M, Jackson DG, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. A quantitative analysis of lymphatic vessels in human breast cancer, based on LYVE-1 immunoreactivity. *Br J Cancer.* 2005 Nov 14;14(10):1168-74.
95. Kelley MC, Hansen N, McMasters KM. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Am J Surg.* 2004 Jul;188(1):49-61
96. Keshtgar MR, Baum M. Axillary dissection over the years: Where to from here? *World J Surg* 2001;25:761-766
97. Korkolis DP, Tsoi E, Fouskakis D, Yiotis J, Koullias GJ, Giannopoulos D, Papalambros E, Nikiteas NI, Spiliopoulou CA, Patsouris E, Asimacopoulos P, Gorgoulis VG. Tumor histology and stage but not p53, Her2-neu or cathepsin-D expression are independent prognostic factors in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2004 May- Jun;24(3b):2061-2068

98. Kreierberg R, Kopp I, Lorenz W, Albert U, Bartsch H, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzel D, Jackisch C, König K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Marschner N, Marx M, v. Minckwitz G, Naß-Grigoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlacke W, Schmutzler R, Schreier I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thommssen C, Untch M, Wagner U, Weis J, Zemmmer T. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. W. Zuckerschwerdt Verlag München, Wien, New York 2008
99. Kunimura T. Noninvasive carcinoma ex pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007 Oct;137(4): 687-688
100. Kute TE, Russell GB, Zbieranski N, Long R, Johnston S, Williams H, Stackhouse C, Wilkins L, Evans I, Berry P, Rimmer K, Tucker E. Prognostic markers in node-negative breast cancer: a prospective study. *Cytometry.* 2004 May; 59 B(1):24-31
101. Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, Yang M, Ferrer F, Karpanen T, Hoffman RM, Ruoslahti E. 2004. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;101(25):9381-6.
102. Lagares-Garcia JA, Garguilo G, Kurek S, LeBlond G, Diaz F. Axillary lymph node dissection in breast cancer: an evolving question? *Ann Surg.* 2000 Jan;66(1):66-72
103. Leek RD. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001 Nov- Dec;21(6B):4325-31.
104. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. 2000. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 15;60(16):4324-7.

105. Liang JT, Huang KC, Jeng YM, Lee PH, Lai HS, Hsu Hc. Microvessel density, cyclo-oxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer. *Br J Surg.* 2004 Mar;91(3):355-361
106. Lin PP, Allison DC, Waistock J, Miller KD, Dooley WC, Friedman N, Baker RR. Impact of axillary lymph node dissection on the therapy of breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 1993 Aug;11(8):1536-1544
107. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):264-71.
108. Manders P, Tjan-Heijnen VC, Span PN, Grebenchtchikov N, Geurts-Moespot A, van Tienoven DT, Beex LV, Sweep FC. Complex of urokinase-type plasminogen activator with its type 1 inhibitor predicts poor outcome in 576 patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer.* 2004 Aug 1;101(3):486-494
109. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):672-682
110. Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(8):1046-1054
111. Megale Costa LJ, Soares HP, Gaspar Ha, Trujillo LG, Santi PX, Pereira RS, de Santanna TL, Pinto FN, del Giglio A. Ratio between positive Lymph nodes and total dissected axillaries lymph nodes as an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 2004.Jun;27(3):304-306

112. Moroy T, Geisen C. Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Aug; 36(8) 1424-1439
113. Morton DL, Wen DR, Wong JH. Technical details of intraoperativ lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992;127:392-399.
115. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livas C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
115. Nisato RE, Tille JC, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis *Thromb Haemost* 2003;90:591-597
116. Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF. Relationship of patients age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol.*1994;12:888-894
117. Noguchi M, Kurosumi M, Iwata H, Miyauchi M, Ohata M, Imoto S, Motomura K, Sato K, Tsugawa K. Clinical and pathologic factors predicting axillary node involvement in breast cancer. *Breast Cancer* 2000.;7(2):114-123
118. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. Lymphatic metastasis in absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002 Jun 7;296 (5574): 1883-1886
119. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gatrex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD;

- Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.
N Engl J Med. (2005) 353: 1659–1672
120. Pierce L, Fowble B, Solin LJ. Conservative surgery and radiation therapy in black Women with early stage breast cancer. Patterns of failure and analysis of outcome. Cancer. 1992;9:2831-2841
 121. Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. Nat Med: Feb 2001; 2(7):151-152
 122. Prall, F; Gringmuth, U; Nizze, H; Barten, M. Microvessel densities and microvascular architecture in clorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival. Histopathology. 42(5): 482-491, May 2003
 123. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltesz I, Dome B. 2005. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 15;11(20):7344-53.
 124. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? Microsc Res Tech. 60(2): 171-80, Feb 2003
 125. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386:671-674
 126. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E; Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagyi GN, Pusztai L. Breast cancaer biomarkers and molecular medicine. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Sept; 3(5):573-585
 127. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer Semin Surg. Oncol. 1989.

128. Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003 Feb;15(1):45-49
129. Shin E, Minami Y, Takatsuka Y, Kawahara K, Kurata A, Tsujinaka T. Optimal management of the axilla in patients with breast cancer. *Breast Cancer* 2000.;7(4):281-283
130. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787-2796
131. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. 2001. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol.* 159(3):893-903.
132. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001 Feb; 7(2): 192-8
133. Somner JE, Dixon JM, Thomas JS. Node retrieval in axillary lymph node dissections : recommendations for minimum numbers to be confident about node negative status. *J Clin Pathol.* 2004 Aug;57(8):845-848
134. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Sept;98(19):10869-10874
135. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 16(9): 922-934, Jul 2002

136. Stacker SA, Hughes RA, Williams RA, Achen MG. 2006. Current strategies for modulating lymphangiogenesis signalling pathways in human disease. *Curr Med Chem.* 13(7):783-92.
137. Sundlisaeter E, Dicko A, Sakariassen PO, Sondenaa K, Enger PO, Bjerkvig R. Lymphangiogenesis in colorectal cancer-prognostic and therapeutic aspects. *Int J Cancer.* 2007 Oct 1;121(7):1401-1409.
138. Sutherland RL; Mushgrove EA. Cyclins and breast cancer
J Mammary Glan Biol Neoplasie 2004 Jan;9(1):95-104
139. Tavassoli F.A., Devilee P. (Hrsg.) : World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003 , 9-110
140. Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie.* Okt. 2003; 26(5):438-445
141. Tille JC, Nisato R, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumour metastasis. *Novartis Found Symp.*2004; 256: 112-31; discussion 132-6, 256-69
142. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.*2002;347:1999-2009
143. Vleugel MM, Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Stel HV, van Diest PJ. Lack of angiogenesis during breast carcinogenesis.
J Clin Pathol. 2004 Jul;57(7):746-51.
144. Vogl G, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Angiogenic potential of ductal carcinoma in situ (DCIS) of human breast. *Histopathology.* 2005 Dec; 47(6):617-624.

145. Weber E, Lorenzoni P, Cavina N, Rossi A, Sacchi G. A novel monoclonal antibody specific for lymphatic endothelium. *Histochem J.* 2000 Nov; 32(11): 653-8
146. Weidner N, Folkman J, Pozza F. Tumor Angiogenesis: A New significant and Independent Prognostic Indicator in Early-Stage Breast Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute:* 1992 Dec 16; 84(24): 1875-87
147. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
148. Weyn B, Tjalma WA, Vermeylen P, van Daele A, Van Marck E, Jacob W. Determinatin of tumor prognosis based on angiogenese-related vascular Patterns measured by fractal and syntatic structure analysis. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2004 Jun; 16(4):307-316.
149. Wigle JT, Harvey N, Detmar N. An essential role for Prox 1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J.* 2002,21:1505-1513
150. Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AI, Jackson DG. Abscense of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol.* 2003 Jun; 200(2):195-206
151. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. TNM-Klassifikation maligner Tumoren Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 6. Aufl. 2002: 121-130
152. Yan HC, Newman PJ, Albelda SM. Epitope mapping of CD 31 (PECAM-1)mAB. In: Schlossmann JM et al., eds. *Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens.* Oxford University Press 1995; 1261-1263

Mein besonderer Dank gilt:

Univ.-Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl

für Bereitstellung der Promotionsproblematik sowie die hervorragende Betreuung, Geduld, sein ständige Hilfsbereitschaft, die vielen wissenschaftlichen Anregungen, die konstruktive Kritik und sein immer offenes Ohr

PD. Dr. rer. nat. A. Berndt

für seine wissenschaftliche Betreuung und die freundliche und konstruktive Begleitung der Dissertation.

Dr. rer. nat. H. Göbel

für seine freundliche und konstruktive Unterstützung bei der Erstellung der Statistiken.

G. Fiedler und K. Tunnat

für die Anfertigung der histologischen Präparate und deren immunhistochemische Bearbeitung.

allen Mitarbeitern des Pathologische Institutes am Helios Klinikum Erfurt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Univ.-Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl

PD Dr. rer. nat. A. Berndt

Dr. rer. nat. H. Göbel

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, 08.03.2008

Klaus Apel